

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de anticuerpos monoclonales funcionales
específicos de ADAM-17**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yesenia Machado Pineda

Director

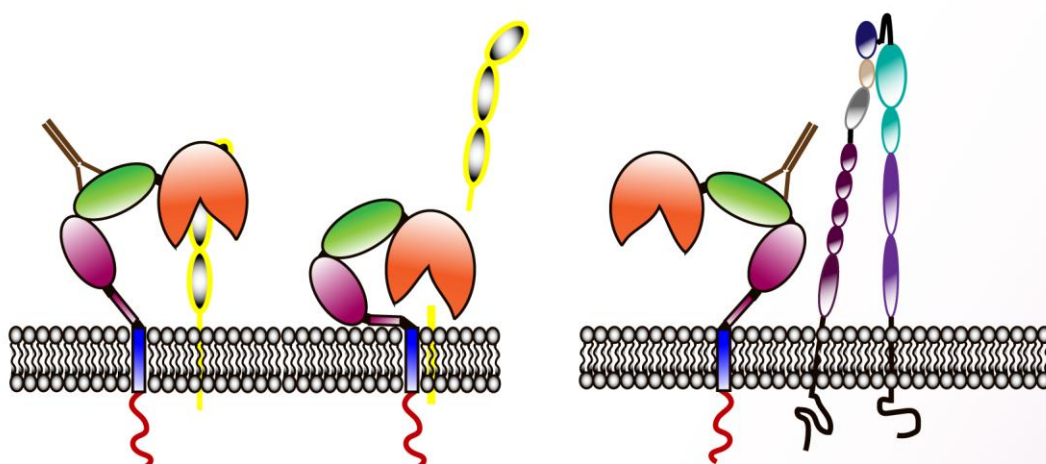
Carlos Cabañas Gutiérrez

Madrid, 2018

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FUNCIONALES ESPECÍFICOS DE ADAM-17



Yesenia Machado Pineda

Director

Carlos Cabañas Gutiérrez

MADRID, 2017

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**Caracterización de anticuerpos
monoclonales funcionales específicos de
ADAM-17**

Yesenia Machado Pineda
Tesis Doctoral

Trabajo dirigido por el **Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez**

Madrid 2017

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**Caracterización de anticuerpos
monoclonales funcionales específicos de
ADAM-17**

Este trabajo ha sido realizado por Yesenia Machado Pineda para optar al grado de Doctor, en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" del CSIC, dirigido por el Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez y bajo la tutoría de la Dra. Yasmina Juarranz Moratilla.

Director de la Tesis

Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez.

Tutora de la Tesis

Dra. Yasmina Juarranz Moratilla

A los pilares de mi vida

“No somos aquello que logramos en la vida, somos todo lo que superamos”

A vertical bar on the left side of the page with a gradient from light gray at the top to purple in the middle, and a solid black square at the bottom.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	9
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	19
SUMMARY	20
ADAM-17	23
Introducción	23
Biosíntesis y Tráfico celular	25
Estructura	27
Sustratos	30
Regulación	32
Funciones	39
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	47
Cultivos Celulares.....	47
Anticuerpos.	47
Purificación de proteínas quiméricas.	48
Generación y purificación de anticuerpos monoclonales frente a ADAM-17.....	49
Plásmidos y transfecciones.....	49
Ensayos de ELISA.....	50
Detección de ALCAM y TNF- α soluble.	52
Citometría de flujo.	52
Preparación de extractos de proteína y análisis por western-blot.....	53
Ensayos de inmunoprecipitación de proteínas.	54
Ensayos de adhesión celular.....	54
Análisis estadístico.....	56
RESULTADOS	59
Obtención de anticuerpos monoclonales frente a ADAM-17.....	59

Caracterización de los anticuerpos monoclonales 2A10 y YES-2.	61
Análisis de los epítomos de unión de los AcMs 2A10 y YES-2 a ADAM-17.....	61
Estudio de la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2 por citometría de flujo.	63
Estudio de los efectos funcionales que ejercen los AcMs 2A10 y YES-2.....	70
Adhesión celular	70
Actividad de corte y liberación de ADAM-17 sobre ALCAM y TNF- α	80
DISCUSIÓN	85
Caracterización de los anticuerpos monoclonales 2A10 y YES-2.	85
Estudio de los efectos funcionales que ejercen los AcMs 2A10 y YES-2.....	89
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA.....	103
ANEXO	113



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

	CASTELLANO	INGLÉS
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina tipo 2	Angiotensin converting enzyme type 2
AcM	Anticuerpo monoclonal	Monoclonal antibody
ADAM	Desintegrina y metaloproteasa	A desintegrin and metalloproteinase
ADAM-TS	ADAM con motivo trombospondina	ADAM with Thrombospondin motifs
ALCAM	Molécula de adhesión celular del leucocito activado	Activated leukocyte cell adhesion molecule
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceína-acetoximetil éster	2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester
β-APP	Proteína precursora beta amiloide	β-amyloid precursor protein
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine serum albumin
CAM	Molécula de adhesión celular	Cell adhesion molecule
CANDIS	Secuencia conservada de interacción dinámica de ADAM diecisiete	Conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence
CD	Antígeno de diferenciación	Cluster of differentiation
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	Complementary deoxyribonucleic acid
DLL 1	Ligando similar al Delta 1	Delta like ligand 1
DMEM		Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
DPPI IV	Dipeptidil-peptidasa IV	Dipeptidil-peptidase IV
DTT	Ditiotreitol	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	Epidermal growth factor
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ABREVIATURAS

ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares	Extracellular signal-Regulated Kinases
ESM	Error estándar de la media	Standard error of the mean
FBS	Suero fetal bovino	Fetal bovine serum
Fc	Fracción constante	Fragment crystallizable
FHL2	Proteína 2 de cuatro dominios y medio LIM	Four and half LIM domain 2 protein
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	Fluorescein isothiocyanate
GHR	Receptor de la hormona del crecimiento	Growth hormone receptor
GPCR	Receptor acoplado a proteína G	G Protein-Coupled Receptor
GP IB α	Glicoproteína IB α	Glycoprotein IB α
GPI	Glicosil fosfatidil inositol	Glycosyl phosphatidyl inositol
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	Heparin-binding epidermal growth factor
HEGR4	Receptor 4 del factor de crecimiento epidérmico humano	Human Epidermal Growth Factor Receptor 4
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HGPRT	Hipoxantina-guanina Fosforribosiltransferasa	Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosylTransferase
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-1RII	Receptor de interleuquina-1 tipo II	Interleukin-1 receptor II
IL-2	Interleuquina-2	Interleukin-2
IL-6R	Receptor de interleuquina-6	Interleukin-6 receptor
iRhom	Romboide inactivo	Inactive rhomboid
JAM	Molécula de unión adherente	Junctional Adhesion Molecule
L1CAM	Molécula de adhesión celular L1	L1-cell adhesion molecule
LDH	Lactato deshidrogenasa	Lactate dehydrogenase
LDLr	Receptor de lipoproteína de baja densidad	Low Density Lipoprotein Receptor
LEL	Dominio extracelular grande	Large extracellular loop

ABREVIATURAS

LPS	Lipopolisacárido	Lipopolysaccharides
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno	Mitogen activated protein kinase
MMP	Metaloproteasas de matriz	Matrix metalloproteinases
NAC	N-acetil-L-cisteína	N-acetyl-L-cysteine
NO	Óxido nítrico	Nitric oxide
OPD	o-fenilendiamina	o-Phenylenediamine
p75NTR	Receptor de neurotrofinas p75	p75 neurotrophin receptor
PACS-2	Proteína con agrupamientos ácido de fosfofurina-2	Phosphofurin acidic cluster sorting protein-2
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate buffered saline
PDI	Proteína disulfuro isomerasa	Protein disulfide isomerase
PEG	Polietilenglicol	Polyethylene glycol
PKC	Proteína quinasa C	Protein kinase C
PMA	Acetato de forbol miristato	Phorbol myristate acetate
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	Phenylmethylsulfonyl fluoride
QPICS	Proteómica cuantitativa para la identificación de sitios de corte	Quantitative Proteomics for the Identification of Cleavage Sites
RE	Retículo endoplasmático	Endoplasmic reticulum
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero	Ribonucleic acid messenger
RPMI		Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecilsulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Dominios de homología Src tipo 2	Src Homology 2
SH3	Dominios de homología Src tipo 3	Src Homology 3
ShRNA	ARN corto en horquilla	Short hairpin RNA
SorLA	Receptor relacionado con la sortilina	Sortilin-related receptor

ABREVIATURAS

SVMP	Metalo proteasas de veneno de serpiente	Snake venom metalloproteinases
TACE	Enzima convertidora de TNF- α	TNF- α converting enzyme
TBS	Tampón Tris salino	Tris buffered saline
TEM	Microdominio enriquecido en tetraspaninas	Tetraspanin-enriched microdomain
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa	Transforming growth factor alpha
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteasas	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TIRFM	Microscopio de fluorescencia de reflexión interna total	Total internal reflection fluorescence microscope
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral	Tumor necrosis factor receptor
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alpha	Tumor necrosis factor-alpha
TRANCE	Citoquina inducida por activación relacionada con TNF	TNF-related activation-induced cytokine
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular	Vascular endothelial growth factor

A vertical bar on the left side of the page with a gradient from light blue at the top to dark blue at the bottom, and a small black square at the very bottom.

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

ADAM-17 es una proteína transmembrana que forma parte de la superfamilia de las metaloproteasas dependientes de zinc. Presenta una organización compleja en dominios funcionales y participa en gran variedad de procesos celulares. Por ello, es muy importante profundizar en el estudio de los mecanismos que regulan la actividad de ADAM-17. El trabajo realizado en esta tesis se ha centrado en obtener herramientas que permitan regular algunos de los procesos controlados por ADAM-17: i) adhesión celular, mediada por la interacción de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17; ii) procesamiento proteolítico, determinado por el corte y la liberación de dos de los sustratos de ADAM-17 (ALCAM y TNF- α). Hemos obtenido y caracterizado dos anticuerpos monoclonales (denominados 2A10 y YES-2) que reconocen específicamente el dominio desintegrina de ADAM-17 humano. La especificidad de estos anticuerpos monoclonales frente a ADAM17 se determinó mediante ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), citometría de flujo y *western-blot*. Estos anticuerpos monoclonales ejercen un efecto inhibitorio en la interacción celular de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17 y con fibronectina en líneas celulares tumorales y leucocitarias y, en consecuencia, inhiben la adhesión mediada por la integrina $\alpha_5\beta_1$. Además, los anticuerpos monoclonales 2A10 y YES-2 aumentan la actividad *sheddas* de ADAM-17 en linfocitos B y monocitos. Por lo tanto, estos anticuerpos podrían utilizarse como herramientas para modular la capacidad adhesiva y proteolítica de ADAM-17.

SUMMARY

ADAM-17 is a transmembrane protein belonging to the superfamily of zinc-dependent metalloproteinases. This protein possesses a complex organization in functional domains and participates in a wide variety of cellular processes. Therefore, it is very important advance in the study of the mechanisms that regulate ADAM-17 activity. In this Doctoral Thesis, we have focused on obtaining tools to regulate some of the processes controlled by ADAM-17: i) cell adhesion, mediated by the interaction between $\alpha 5\beta 1$ integrin with ADAM-17; ii) proteolytic ectodomain release, determined by the cleavage and release of two ADAM-17 substrates (ALCAM and TNF- α). We have generated and characterized two monoclonal antibodies (named 2A10 and YES-2), against the desintegrin domain of human ADAM-17. The specificity of these monoclonal antibodies against ADAM-17 was tested by enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA), flow cytometry and western blotting. These monoclonal antibodies inhibit the cellular interaction between the $\alpha 5\beta 1$ integrin and ADAM-17 or with fibronectin in tumor and leukocyte cell lines and consequently, inhibit cell adhesion mediated by the $\alpha 5\beta 1$ integrin. In addition, monoclonal antibodies 2A10 and YES-2 increase the sheddase activity of ADAM-17 in B lymphocytic and monocytic cell lines. Taken together, these results suggest that these antibodies could be used as tools to modulate the adhesive and sheddase activities of ADAM-17.



INTRODUCCIÓN

ADAM-17

Introducción

Las ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) son glicoproteínas transmembrana de tipo I dependientes de zinc, que forman parte de la superfamilia de las metaloproteasas. El nombre de estas proteínas hace alusión a su similitud con los dominios estructurales que se caracterizaron inicialmente en otros miembros de esta gran familia, denominados SVMP (*Snake Venom MetalloProteinase*) (Wolfsberg et al., 1995). Otros integrantes de la superfamilia de las metaloproteasas son: ADAM-TS (*ADAM with ThromboSpondin motifs*) y MMP (*Matrix MetalloProteinase*) (Edwards et al., 2008). Funcionalmente, la familia de las ADAMs realiza dos papeles principales: proteólisis y adhesión. Estas actividades permiten a las metaloproteasas participar en gran variedad de procesos celulares como adhesión, invasión, angiogénesis, metástasis, inflamación, aterosclerosis, espermatogénesis, fertilización, cicatrización de heridas y guía de axones y neuritas (Chang and Werb, 2001; DeClerck, 2000; Moss et al., 2001; Primakoff and Myles, 2000; Schlondorff and Blobel, 1999; Seals and Courtneidge, 2003).

Además de encontrarse en mamíferos, también se han descubierto ADAMs en gran variedad de organismos: levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*), nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y en dípteros (*Drosophila melanogaster*) (Blobel, 2005). En el genoma humano se han identificado 22 miembros dentro de la familia de las ADAMs (**Tabla 1**) (Mullooly et al., 2016). Aunque todos los miembros de la familia presentan el dominio metaloproteasa, sólo 12 miembros son activos catalíticamente al conservar intacto el motivo consenso HExxH. Esta secuencia participa en la coordinación de un átomo de zinc (presente en el sitio activo de la enzima) con un residuo libre de cisteína del prodominio, imprescindible para inhibir la actividad enzimática de las ADAMs (Howard et al., 1996). Esta actividad catalítica es indispensable para el proceso de corte y liberación (*shedding*) de proteínas de membrana originando así su forma soluble. Dicho proceso remodela la superficie de las células y regula la función de un gran número de proteínas transmembrana (factores de crecimiento, moléculas de adhesión, receptores de factores de crecimiento y citoquinas) (Edwards et al., 2008). Además, influye en la comunicación celular por su capacidad de regular las interacciones celulares (Le Gall et al., 2010). En 1997, dos grupos de investigación descubrieron simultáneamente la metaloproteasa responsable del *shedding* de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor - α*) denominada **ADAM-17** o también conocida como **TACE** (*TNFA α Converting Enzyme*), **CD156b**, **cSVP** y **MGC71942** (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Más tarde, se demostró que ADAM-17 era responsable del

INTRODUCCIÓN

procesamiento de múltiples ligandos y receptores, involucrando a la enzima en la regulación de diversos procesos biológicos (Smalley and Ley, 2005).

ADAMs	FUNCIONES
ADAM-1/2	Espermatogénesis y fertilización.
ADAM-7	Fertilización.
*ADAM-8	Adhesión, angiogénesis e inflamación.
*ADAM-9	Adhesión, angiogénesis, migración y proliferación.
*ADAM-10	Adhesión, angiogénesis, supervivencia, invasión, inflamación, migración y proliferación.
ADAM-11	Adhesión neural y ligando de integrinas.
*ADAM-12	Angiogénesis, migración y proliferación.
*ADAM-15	Sin determinar.
*ADAM-17	Adhesión, angiogénesis, supervivencia, invasión, inflamación, migración y proliferación.
ADAM-18	Sin determinar.
*ADAM-19	Angiogénesis, adhesión, inflamación e invasión.
*ADAM-20	Fertilización.
*ADAM-21	Funciones en el Sistema Nervioso Central.
ADAM-22/23/29	Sin determinar.
*ADAM-28	Proliferación.
*ADAM-30	Sin determinar.
*ADAM-33	Angiogénesis.

Tabla 1. Miembros de la familia ADAMs. En el cuadro se muestran los componentes de la familia de las ADAMs y sus funciones principales. El asterisco (*) indica que poseen actividad metaloproteasa (Mullooly et al., 2016).

El gen que codifica a ADAM-17 en humanos tiene un tamaño de aproximadamente 50 kb, está formado por 19 exones y se localiza en la región 2p25 del cromosoma 2 (Mezyk et al., 2003). El RNAm (*RiboNucleic Acid messenger*) de ADAM-17 se encuentra en una gran variedad de tejidos, lo que sugiere que el gen se expresa de manera ubicua y constitutiva (Black et al., 1997).

No obstante, los niveles de ADAM-17 no son constantes y dependen de varios factores: estado de desarrollo celular, presencia de ciertos compuestos (las citoquinas, los factores de crecimiento o los ésteres de forbol) , localización celular y situaciones patológicas (Borrell-Pages et al., 2003; Bzowska et al., 2004; Wang et al., 2000). En tejido adulto se detectan niveles altos del RNAm en corazón, placenta, músculo esquelético, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios e intestino delgado, mientras que en tejido fetal se detectan niveles altos en cerebro, pulmón e hígado (Black et al., 1997).

Biosíntesis y Tráfico celular

ADAM-17 se sintetiza como un precursor enzimático inactivo, siendo necesario el procesamiento proteolítico de su prodominio para convertirse en una enzima madura. Después de la síntesis de ADAM-17, se produce su translocación del retículo endoplasmático (RE) al aparato de Golgi, donde tiene lugar la maduración de la enzima (Schlondorff et al., 2000). La maduración de ADAM-17 consiste en la escisión del prodominio que es llevada a cabo por las proconvertasas (Srouf et al., 2003). Las proconvertasas cortan a ADAM-17 en la secuencia de reconocimiento RxK/RR (clásica), localizada entre el prodominio y el dominio metaloproteasa (Endres et al., 2003). Estudios recientes proponen que el sitio de reconocimiento clásico de las proconvertasas no es suficiente para la eliminación del prodominio, sino que previamente, las proconvertasas tienen que unirse a una secuencia de escisión adicional para dar lugar a cambios conformacionales que exponen la secuencia de reconocimiento clásica (Wong et al., 2015), permitiendo que las proconvertasas actúen. Este proceso de maduración de ADAM-17 regula su ciclo de vida (**Figura 1**), dividiendo el reservorio de la enzima en una gran cantidad intracelular de forma inmadura/madura y en una pequeña cantidad de forma madura expresada en la superficie celular (Lorenzen et al., 2016). El transporte de ADAM-17 del RE al Golgi es dependiente de las proteínas iRhoms (*inactive rhomboid*), que forman parte de la superfamilia de proteínas multitransmembrana denominadas romboides. Estas proteínas, poseen entre seis o siete dominios transmembrana y están presentes tanto en animales como en bacterias, plantas y hongos. Los romboides son proteasas de serina (catalíticamente activas e inactivas), que se caracterizan por poseer el sitio de proteasa activo dentro de la membrana. Recientemente se ha descubierto que iRhomb2 interacciona con ADAM-17 en el RE promoviendo su maduración enzimática y el tráfico hacia la superficie celular (Adrain et al., 2012), aunque el mecanismo subyacente de éste fenómeno todavía se desconoce (Xu et al., 2016).

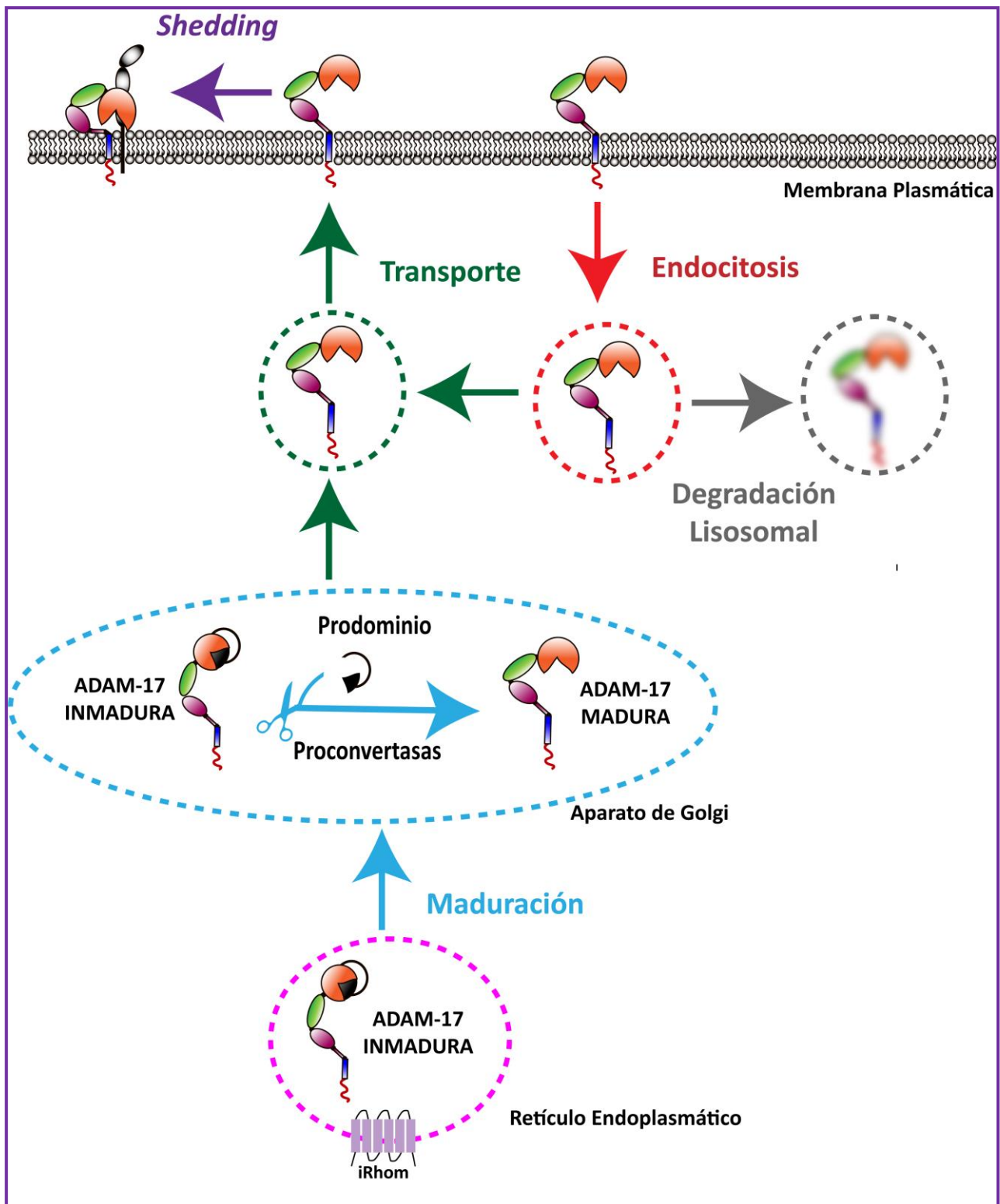


Figura 1. Ciclo de vida de ADAM-17. ADAM-17 coexiste como forma inmadura y madura en las células. Después de que ADAM-17 se traduzca en el RE, viaja vía iRhom dependiente al Golgi, donde tiene lugar su maduración. La mayoría del ADAM-17 maduro se localiza intracelularmente, mientras que sólo una pequeña cantidad se localiza en la superficie celular (donde ocurre el *shedding*). Esto es debido a que gran parte del ADAM-17 maduro que viaja a la superficie celular se internaliza, se recicla o se degrada vía lisosomal (Modificada de Lorenzen et al., 2016).

Estructura

El descubrimiento de la estructura de las ADAMs se debe principalmente a dos grandes avances científicos: los progresos en técnicas de cristalografía de rayos X y las mejoras en el aislamiento de los dominios de las proteínas (Maskos et al., 1998; Takeda et al., 2006). ADAM-17 es una glicoproteína que atraviesa una vez la membrana plasmática y se organiza en dominios (**Figura 2**). Desde el extremo amino terminal se suceden: un péptido señal (aminoácidos 1 al 17), seguido por cuatro ectodominios diferentes (aminoácidos 18-671), el dominio transmembrana (aminoácidos 672 al 694) y termina en una cola citoplasmática (aminoácidos 695 al 824). Los cuatro ectodominios son: el prodominio (aminoácidos 18 al 214), el dominio metaloproteasa o catalítico (aminoácidos 215 al 473), el dominio desintegrina (aminoácidos 474 al 572) y el dominio próximo a la membrana (aminoácidos 573 al 671) (Black, 2002).

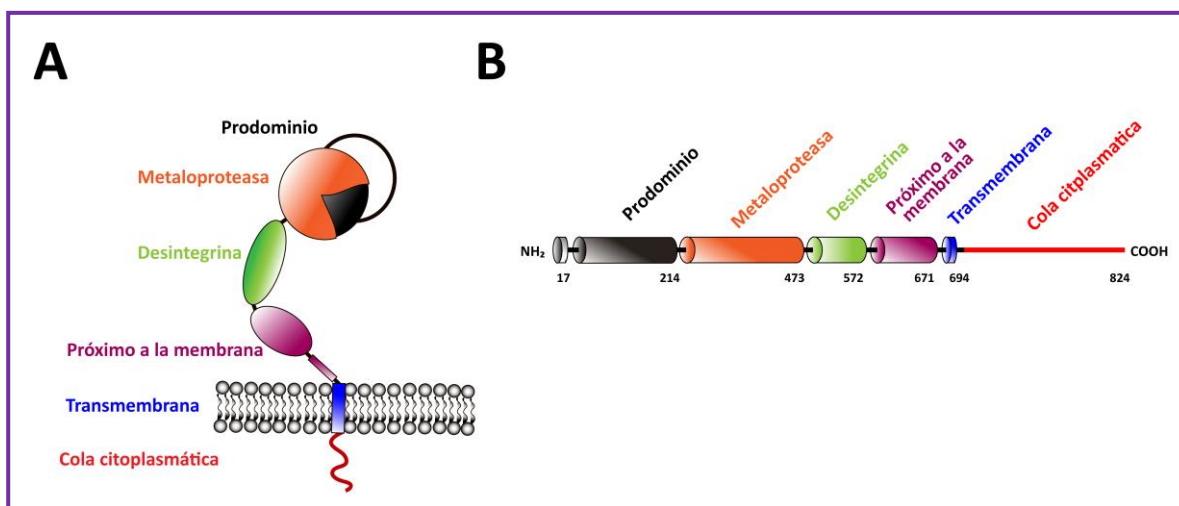


Figura 2. Estructura de ADAM-17. La imagen del panel **A** representa la estructura de los dominios de ADAM-17, su anclaje a la membrana plasmática y su orientación hacia el medio extracelular. Concretamente, se esquematiza la forma inmadura de ADAM-17 puesto que se representa con su prodominio intacto. No obstante, la mayor cantidad de ADAM-17 expresada en la membrana plasmática corresponde a su forma madura, es decir, sin el prodominio (Modificada de Trad et al., 2013). El panel **B** muestra una representación lineal y desplegada de los distintos dominios de esta proteína. Además se indican la posición de los aminoácidos que delimitan cada dominio (Modificada de Jones et al., 2016).

Prodominio

Sus principales funciones consisten en evitar que el zimógeno (precursor enzimático con actividad proteolítica latente) se active e impedir la degradación de ADAM-17 mientras se transporta hacia la membrana plasmática (Gonzales et al., 2004; Mullooly et al., 2016). El

prodominio, que es similar al de otras ADAMs y metaloproteasas de matriz, actúa como un inhibidor de la actividad de la proteasa a través del mecanismo de conmutación de cisteína (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). El residuo de cisteína libre de la secuencia PKV**C**GY¹⁸⁶ (presente en el prodominio), se coordina con el átomo de zinc del sitio activo de la proteasa (localizado en el dominio metaloproteasa), evitando que se active enzimáticamente antes de la maduración de la enzima (Grotzinger et al., 2017; Xu et al., 2016). Por lo tanto, la eliminación del prodominio se considera un requisito previo e indispensable para que ADAM-17 se active (Milla et al., 1999). Se han identificado dos regiones discontinuas determinantes para la función autoinhibitoria que ejerce el prodominio en la actividad de ADAM-17: T⁷² y el motivo DDVI¹³⁷ (Gonzales et al., 2008), al observar que la mutación del residuo de cisteína, por una alanina, no es suficiente para impedir el efecto inhibitorio que ejerce la presencia del prodominio en la actividad de la enzima (Milla et al., 1999). Aunque la eliminación del prodominio no es necesario para su transporte a la membrana plasmática (Peiretti et al., 2003), la mayor parte de la enzima presente en la membrana plasmática está en su forma activa (Schlondorff et al., 2000). No obstante, el prodominio también actúa como una chaperona intramolecular, facilitando el correcto plegado/mantenimiento de la proteína y protegiendo a la enzima de la degradación por la vía secretora (Leonard et al., 2005).

Dominio Metaloproteasa

En este dominio se localiza el sitio activo de la enzima que posee una secuencia altamente conservada dentro de la familia de metaloproteasas: HExxHxxGxxH (Reiss and Saftig, 2009), responsable de coordinar un átomo de zinc del sitio activo con un residuo de cisteína libre del prodominio (Black and White, 1998; Grotzinger et al., 2017), mecanismo necesario para la función inhibitoria que ejerce la presencia del prodominio. La especificidad del centro catalítico para los sitios de corte de los sustratos, está determinada principalmente por los sitios P1-P3 y P1'-P3'. Los aminoácidos fundamentales para el reconocimiento de los sustratos, se determinaron por QPICS (*Quantitative Proteomics for the Identification of Cleavage Sites*) y el análisis sugiere que el sitio P1' podría ser el más importante y se encuentra preferentemente ocupado por residuos de valina (Tucher et al., 2014). Estos datos apoyan los estudios realizados sobre los sitios de corte de ADAM-17 recientemente identificados en sus sustratos nativos (Riethmueller et al., 2017).

Dominio Desintegrina

Denominado así por su similitud con las desintegrinas de los venenos de serpiente (Reddy et al., 2000). El análisis de la secuencia de los dominios desintegrinas en la familia de las ADAMs

reveló que solamente ADAM-15 contiene el motivo RGD de unión a integrinas, aunque otras ADAMs interaccionan también con las integrinas (Grotzinger et al., 2017). Este dominio se encuentra implicado en los procesos de adhesión y migración celular. La especificidad de las interacciones dominio desintegrina-integrina no se conocen en profundidad, pero según los últimos estudios, múltiples miembros de las ADAMs se pueden unir a la misma integrina e integrinas específicas pueden unirse de diferente manera a los miembros de la familia de las ADAMs (Mullooly et al., 2016). Concretamente, ADAM-17 interacciona con la integrina $\alpha_5\beta_1$ en la membrana celular, pudiendo ocurrir esta interacción en la misma célula (*cis*), o entre dos células (*trans*) (Bax et al., 2004; Trad et al., 2013). Curiosamente, la interacción entre ambas moléculas se produce también dentro de las células, ya que en estudios de colocalización entre $\alpha_5\beta_1$ /ADAM-17 demostraron que ambas proteínas co-localizaban en regiones perinucleares donde la mayoría de ADAM-17 se almacena antes de su transporte a la superficie celular (Gooz et al., 2012). Además de interaccionar con las integrinas, el dominio desintegrina actúa como un andamio, siendo responsable de la estructura en forma de C de los ectodominios de ADAM-17, formando un puente entre el dominio catalítico y el dominio próximo a la membrana para asegurar la rigidez de los ectodominios (Takeda et al., 2006).

Dominio próximo a la membrana

ADAM-17 y su homólogo ADAM-10, no contienen la estructura clásica del dominio próximo a la membrana común entre otros miembros de la familia. Estas metaloproteasas contienen secuencias ricas en cisteínas y un tallo de pequeño tamaño que contiene un péptido helicoidal de carácter anfipático denominado CANDIS (*Conserved ADAM seventeen Dynamic Interaction Sequence*) (Dusterhoft et al., 2015; Mullooly et al., 2016). Tras el análisis estructural del dominio, se reveló que posee dos conformaciones diferentes, que están reguladas por las PDIs (*Protein Disulfide Isomerase*): una forma abierta y flexible y otra cerrada y más rígida (Willems et al., 2010). La conformación del dominio próximo a la membrana influye directamente en la capacidad de interactuar con los sustratos, ya que la interacción solo es posible si el dominio está en la conformación abierta (Dusterhoft et al., 2014). No obstante, no se ha descrito el mecanismo que desempeña este dominio no catalítico en la actividad *sheddas* de ADAM-17 (Grotzinger et al., 2017). Este dominio está implicado en varios procesos como el reconocimiento del sustrato, la maduración de la proteína (Milla et al., 1999; Reddy et al., 2000), la regulación de la interacción de las integrina con el dominio desintegrina (Mullooly et al., 2016) y la regulación del procesamiento de los sustratos (Grotzinger et al., 2017).

Dominio transmembrana

Este dominio es responsable del anclaje de las ADAMs a la membrana plasmática (Mullooly et al., 2016) y regula la rápida activación de ADAM-17 (Le Gall et al., 2010; Li et al., 2017). Además, participa en la regulación del reconocimiento del sustrato (Li et al., 2007).

Cola citoplasmática

Presenta sitios potenciales de interacción con dominios SH2 y SH3 (*Src Homology 2/3*), un sitio de fosforilación en tirosina (Moss et al., 1997), un sitio de fosforilación por MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) (Díaz-Rodríguez et al., 2002), tres sitios putativos de fosforilación por PKC (*Protein Kinase C*) y algunos sitios potenciales de fosforilación por caseína quinasa II (Reiss and Saftig, 2009). Estos sitios de fosforilación están implicados en la modulación del *shedding* de proteínas de membrana (Mullooly et al., 2016), participando en la regulación de la función proteasa, la maduración y el transporte intracelular. Todas estas interacciones intervienen en las cascadas de señalización *inside-out/outside-in* (Seals and Courtneidge, 2003). No obstante, la ausencia de la región citoplasmática, no elimina la actividad de ADAM-17 (Le Gall et al., 2010); por ello, deben de existir otras vías para transmitir la señal de activación a través de la membrana hasta la superficie celular.

Sustratos

Existen numerosas proteínas susceptibles de ser procesadas por ADAM-17 (Tabla 2) (Scheller et al., 2011). El estudio de sus sustratos se ha realizado mediante abordaje genético (fibroblastos derivados de ratones deficientes para la actividad de ADAM-17, denominados ratones ADAM-17 $\Delta Z_n/\Delta Z_n$) y gracias a estudios *in vitro* con proteínas recombinantes o péptidos modelo. Actualmente existen más de 80 sustratos caracterizados (Lorenzen et al., 2016) que son funcional y estructuralmente heterogéneos y que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, receptores de citoquinas e interleucinas y CAMs (*Cell Adhesion Molecule*) (Arribas and Esselens, 2009; Dusterhoft et al., 2015; Kawahara et al., 2017). Se ha investigado el mecanismo de reconocimiento de los sustratos por ADAM-17, llegando a las siguientes conclusiones: sólo el 2-3% de las proteínas de membrana sufren procesos de corte y liberación (Arribas et al., 1996); los sitios de corte por ADAM-17 en los diferentes sustratos no poseen ninguna característica en común (Mullberg et al., 2000) excepto que la secuencia de corte tiene que localizarse entre los 10 o 15 primeros aminoácidos desde la membrana plasmática (Mullooly et al., 2016); es necesario que ADAM-17 se ancle a la membrana plasmática para realizar correctamente su

INTRODUCCIÓN

función (Reddy et al., 2000) y sustrato/enzima deben localizarse en la misma célula (Itai et al., 2001).

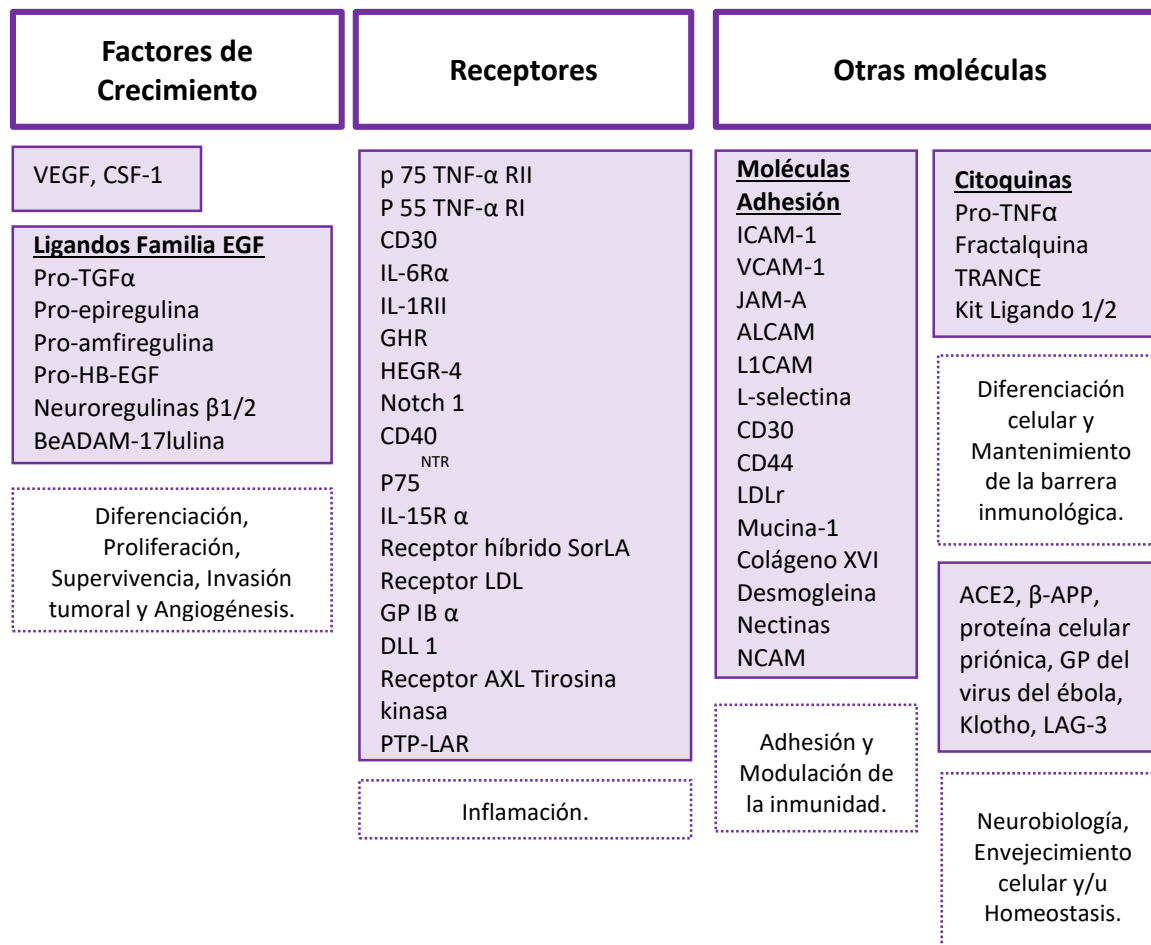


Tabla 2. Sustratos más conocidos de ADAM-17. Resumen de los sustratos susceptibles de ser procesados por ADAM-17 y su repercusión en la funcionalidad celular (Modificada de Xu et al., 2016).

Por todo ello, se ha sugerido que la selección de los sustratos sobre los que actúa ADAM-17, no es una selección por secuencia si no por la estructura terciaria de las proteínas (Hinkle et al., 2004). Los últimos avances en el análisis del reconocimiento del sustrato por ADAM-17, indican la existencia de dos mecanismos distintos de reconocimiento del sustrato dependiendo de la topología del sustrato. Concretamente, para los sustratos de topología I, como son IL-1RII (*InterLeukin-1 Receptor II*) e IL-6R (*InterLeukin-6 Receptor*), sólo el dominio próximo a la membrana de ADAM-17 es indispensable para el reconocimiento, pero no sucede lo mismo para los sustratos de tipo II (como el TNF- α) (Lorenzen et al., 2012). Además, se ha demostrado que los activadores de ADAM-17 inducen la exposición de fosfatidilserinas en la membrana celular (se translocan del foliolo interno al externo de la membrana plasmática), provocando que la enzima se una a la membrana a través del motivo conservado CANDIS, facilitando de este modo

el inicio del proceso de corte y liberación de sus sustratos (Sommer et al., 2016). La unión del dominio próximo a la membrana va acompañada de un cambio conformacional de los ectodominios de ADAM-17, y de este modo, el sitio activo del dominio catalítico se encuentra muy próximo a los sitios de escisión localizados en los sustratos (Grotzinger et al., 2017).

Regulación

ADAM-17 es un componente crucial en muchas vías de señalización puesto que, al estar presente en la mayoría de tejidos del cuerpo humano, participa en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Sus niveles de expresión en la membrana plasmática en los diferentes linajes celulares no son muy elevados como consecuencia de los diferentes mecanismos que regulan su actividad (Rose-John, 2013). La regulación de la actividad de ADAM-17 es un proceso de múltiples etapas y solo está totalmente activa después de superar todos los puntos de control. Aún se desconoce el mecanismo exacto de regulación de la actividad de ADAM-17 pero puede ser regulado en cualquier punto de su biosíntesis, transporte o activación.

Activación

Los ésteres de forbol en tiempos cortos actúan directamente sobre la capacidad catalítica de la enzima, aumentando la capacidad proteolítica de ADAM-17, sin modificar la cantidad de la metaloproteasa presente en la superficie celular. Aproximadamente 3 horas después del tratamiento con ésteres de forbol, las células recuperan los niveles normales de proTGF- α (*Transforming Growth Factor- α*) en la superficie celular, indicando que la activación de ADAM-17 se elimina aproximadamente 2 horas después de su activación (Arribas et al., 1997). Este resultado se apoya en experimentos que muestran cómo el tratamiento de células con ésteres de forbol durante 1,5 horas regula negativamente la cantidad de forma madura de ADAM-17 en la superficie (Doedens and Black, 2000; Endres et al., 2003). No obstante, no está claro si el mecanismo de modulación negativa observado con tratamientos con ésteres de forbol es general, puesto que en células activadas con acetilcolina, los niveles de ADAM-17 madura permanecen inalterados (Endres et al., 2003). Se ha sugerido que la razón por la que ADAM-17 tiene una relativa inactividad en células no estimuladas es porque se encuentra acoplada a moléculas inhibitoras, lo que indica que ADAM-17 se disocia y queda libre para cortar a sus sustratos cuando estimulamos las células con determinados compuestos (Doedens et al., 2003; Grotzinger et al., 2017).

Localización celular

La mayoría del ADAM-17 se localiza en un compartimento perinuclear y solo un pequeño porcentaje de la proteína madura está presente en la superficie celular (Matthews et al., 2016; Sinnathamby et al., 2011). Tratamientos de 30 minutos con el éster de forbol PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) no cambian la distribución de ADAM-17 de manera significativa (Schlondorff et al., 2000), aunque tratamientos más largos con PMA producen una disminución de la expresión de ADAM-17 en membrana por internalización y degradación de la misma, aunque no se conocen en la actualidad las vías de internalización implicadas. Estos resultados están en consonancia con la presencia de la región de internalización YESL en la cola citoplasmática de ADAM-17, que contiene motivos potenciales para la internalización dependiente de clatrina. Al inhibirse este motivo se bloquea la endocitosis y se ralentiza el proceso de internalización, aunque no lo evita por completo. Estos hallazgos indican un posible efecto de los ésteres de forbol sobre la maduración de ADAM-17 dependiente de la formación de vesículas y de la endocitosis (Doedens and Black, 2000; Lorenzen et al., 2016). Además, ADAM-17 experimenta un reciclado endocítico dependiente de PACS-2 (*Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein-2*). En condiciones basales, el *knock-out* de PACS-2 en ratones conduce a un deterioro del reciclaje de ADAM-17, favoreciendo su degradación (Dombernowsky et al., 2015). Estudios recientes han comparado la activación, la expresión en membrana y la internalización de ADAM-17 en respuesta a diferentes estímulos, concluyendo que estímulos fisiológicos (como trombina e histamina) no afectan a la localización de ADAM-17. Los estímulos no fisiológicos (como PMA), inducen un rápido aumento de ADAM-17 maduro en la superficie celular de líneas celulares HEK293 o HeLa, seguido de internalización y degradación lisosomal de la proteasa. Eventualmente, la estimulación con PMA vacía el reservorio de ADAM-17 maduro en cuestión de horas (sin afectar al reservorio de ADAM-17 inmaduro) y no se observa una recuperación completa de la reserva de ADAM-17 maduro, incluso después de 24 horas. Con el fin de acelerar el tráfico del RE a Golgi, se ha sobreexpresado iRhom1, no siendo suficiente para impedir la desaparición de la proteasa madura cuando se efectúa el tratamiento con PMA. En resumen, los diferentes estímulos causan diferentes modos de activación, internalización y degradación de ADAM-17, lo que es importante para comprender la señalización fisiológica y fisiopatológica en la que participa la enzima (Lorenzen et al., 2016).

Modificaciones post-traduccionales

Una de las modificaciones post-traduccionales más importantes de ADAM-17 es la **eliminación del prodominio** que ocurre en la red trans-Golgi, dando lugar a la forma madura de

la enzima, como se ha descrito anteriormente. De hecho, mutantes o células deficientes en Furina (proconvertasas), presentan una reducción del corte y liberación de los sustratos (Peiretti et al., 2003). La presencia del prodominio puede inhibir la enzima, lo cual está muy bien documentado para ADAM-10 y ADAM-17 (Edwards et al., 2008). Otras modificaciones post-traduccionales incluyen la **glicosilación**, la **fosforilación** y la **isomerización** de la enzima. Existen seis sitios putativos de N-glicosilación en ADAM-17, tres de ellos se localizan en el dominio metaloproteasa, dos en el dominio desintegrina y otro en el dominio próximo a la membrana (Clarke et al., 1998). Lo que sugiere que la glicosilación puede ser un regulador importante de la actividad de ADAM-17. Sin embargo, no hay datos que demuestren cómo la glicosilación de ADAM-17 afecta la actividad y/o transporte de la enzima. Otra modificación post-traducciona importante de la enzima es su fosforilación, ya que en la cola citoplasmática se localizan diversos sitios de fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina, cruciales para la regulación de la actividad proteolítica de ADAM-17. Para comprender mejor estos fenómenos, se necesita estudiar las modificaciones post-traduccionales de ADAM-17 en células primarias y utilizar un mayor número de estímulos fisiológicamente relevantes (Gooz, 2010). En los dominios desintegrina y próximo a la membrana, se localizan dos sitios potenciales de isomerización con motivos tipo CxxC altamente conservados, susceptibles de sufrir cambios por la acción de agentes que modifiquen el entorno redox celular. Condiciones reductoras, por ejemplo en presencia de DTT (*DiThioThreitol*), provocan una disminución de la actividad de la enzima, mientras que condiciones oxidantes (en presencia de peróxido de hidrógeno) aumentan significativamente la actividad proteolítica de ADAM-17 (Wang et al., 2009).

Transporte a la superficie celular

Todavía no está claro si el *shedding* sólo transcurre en la superficie celular, o cerca de ella, o si también sucede en vesículas intracelulares (Lorenzen et al., 2016). Un posible punto de control de la actividad de ADAM-17 es la regulación del transporte de la proteasa hacia la superficie celular. Por este motivo, se ha estudiado en profundidad el papel de las quinasas sobre el tráfico intracelular de ADAM-17, observando que la modificación de ADAM-17 en T⁷³⁵, por efecto de p38 MAPK, es un paso clave para la maduración de la proteasa y su transporte hacia la superficie celular (Xu and Derynck, 2010). Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas iRhoms (1 y 2) son componentes esenciales para el tráfico de ADAM-17 desde el RE al aparato de Golgi. El *knock-out* de ambas iRhoms provocan diversos efectos como: un fallo en el transporte de ADAM-17 del RE al Golgi, la falta de maduración de la enzima y la pérdida del *shedding* mediado por ADAM-17 (Matthews et al., 2016).

Co-localización del sustrato y la enzima en la membrana plasmática

ADAM-17 se localiza en balsas lipídicas en condiciones normales (Grotzinger et al., 2017). La presencia de los ésteres de forbol inducen la distribución de ADAM-17 en áreas especializadas de la membrana plasmática (*ruffling areas*). Tras su relocalización, se ha observado que se produce la activación del *shedding* de CD44 (molécula de adhesión que interacciona con el ácido hialurónico). Este suceso abre la posibilidad de que cambios en la localización de la enzima en la superficie celular contribuyan a la regulación del *shedding* de sus sustratos (Nagano et al., 2004). De igual manera, compuestos que eliminan los dominios ricos en colesterol de las membranas celulares desestabilizan las balsas lipídicas (regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos) y aumentan el *shedding* de IL-6R y TNF- α mediado por ADAM-17 (Matthews et al., 2003; Tellier et al., 2006). Además, concentraciones altas de colesterol bloquean la unión de la secuencia conservada CANDIS a la membrana plasmática, disminuyendo la actividad *sheddas* de la enzima. Estos datos sugieren un papel regulador de la composición lipídica de la membrana plasmática en la actividad ADAM-17, al modificar la accesibilidad de ADAM-17 al sustrato (Dusterhoft et al., 2015).

Asociación con proteínas de la superficie celular

Se ha descrito que ADAM-17 interacciona con distintas proteínas de la superficie celular entre las que se encuentran:

–**FHL2** (*Four and Half LIM domain 2 protein*): la unión a la enzima se produce a través de la cola citoplasmática del ADAM-17 maduro (aminoácidos del 721 al 739). En ausencia de FHL2 en la superficie celular se produce un aumento de la expresión de ADAM-17, y en condiciones de estimulación con PMA, se incrementa el procesamiento de dos sustratos de ADAM-17 (TNFR-1 y 2, *Tumor Necrosis Factor Receptor*) (Canault et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que la interacción de FHL2 con ADAM-17 es más frecuente en el adenocarcinoma colorrectal que en el adenoma y la mucosa normal del colon. Lo que sugiere que el aumento de la interacción de estas proteínas se produce en las etapas finales de la carcinogénesis colorrectal (Verset et al., 2017).

–**Tetraspanina CD9** (*Cluster of Differentiation 9*): se asocia directamente a ADAM-17 a través de su dominio LEL (*Large Extracellular Loop*) en la membrana plasmática de líneas celulares humanas monocíticas y endoteliales. Dicha interacción produce la inhibición de la actividad catalítica de ADAM-17 responsable del corte de dos de sus sustratos (TNF- α e ICAM-1, *Intercellular Adhesion Molecule-1*) en linfocitos T, células monocíticas, endoteliales y carcinoma de colon (Gutierrez-Lopez et al., 2011).

– **PDIs:** catalizan la formación y ruptura de los puentes disulfuro entre cisteínas, regulando negativamente la actividad proteolítica de ADAM-17 (**Figura 3**). La acción de las PDIs sobre los puentes disulfuro del dominio próximo a la membrana, provoca un cambio conformacional en ADAM-17 (la forma madura de la enzima posee 16 puentes disulfuro), confiriendo a la enzima una conformación cerrada/rígida (no accesible al sustrato). En ausencia de actividad de las PDIs, la conformación es abierta/flexible (accesible al sustrato) (Dusterhoft et al., 2013; Willems et al., 2010). Para explicar por qué la conformación cerrada corresponde al estado inactivo de la enzima, se comprobó que las fosfatidilserinas solo se unen al dominio próximo a la membrana cuando está en la conformación abierta y no se unen a la conformación rígida. Por lo tanto, la exposición de la fosfatidilserinas estaría facilitando el proceso de corte y liberación de sus sustratos (Sommer et al., 2016). Todavía se está investigando cómo ADAM-17 con la conformación abierta del dominio próximo a la membrana, evita su inactivación durante su paso por el RE, ya que las PDIs son muy abundantes en ese orgánulo. Una posible explicación es que existan moléculas que actúen como chaperonas protegiendo la conformación abierta, o incluso, al propio prodominio, razón por la cual, la estructura de ADAM-17 tiene forma de C, facilitando que el prodominio se localice en una posición que pueda interactuar con el dominio próximo a la membrana (Grotzinger et al., 2017).

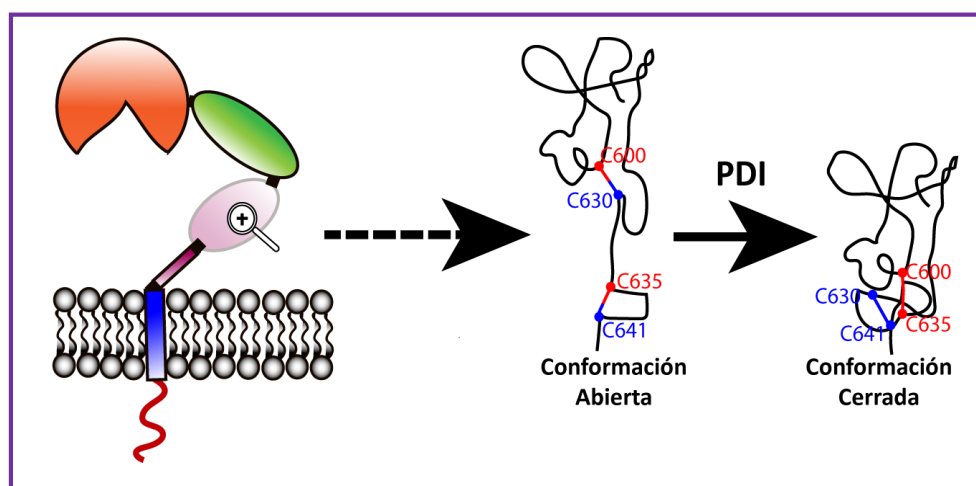


Figura 3. Regulación de ADAM-17 mediada por PDIs. La imagen representa la isomerización específica que catalizan las PDIs. La presencia de las PDIs cambia el patrón de puentes disulfuro entre determinadas cisteínas que se encuentran en el dominio próximo a la membrana, cambiando de una disposición secuencial (abierta) (C^{600} - C^{630} y C^{635} - C^{641}) a una disposición de solapamiento (cerrada) (C^{600} - C^{635} y C^{630} - C^{641}). Este cambio induce una modificación conformacional en ADAM-17, provocando que no esté accesible al sustrato. Mientras que en la conformación abierta la enzima está activa (Modificado de Dusterhoft et al., 2013).

–**Integrinas:** investigaciones previas han confirmado que el dominio desintegrina de muchos miembros de la familia ADAMs, actúa como sitio de unión de integrinas. En particular, ADAM-17 es ligando de la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Bax et al., 2004; Gooz et al., 2012). El complejo formado entre la integrina $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17 mantiene a la proteasa en un estado inactivo reversible, bloqueando la actividad de *shedding* de la enzima (Figura 4), debido a que el impedimento estérico disminuye la accesibilidad al sitio activo de ADAM-17 (Trad et al., 2013). La activación de las integrinas y ADAM-17, disuelve el complejo y libera a las moléculas en su forma activa. Como se ha mencionado anteriormente, ADAM-10 es homólogo de ADAM-17, pero su actividad proteasa difiere en que el procesamiento de los sustratos por parte de ADAM-10 se produce de manera constitutiva, mientras que ADAM-17 tiene que ser activado para poder llevar a cabo el *shedding*. Puesto que no se conoce nada sobre la interacción inhibitoria entre el dominio desintegrina de ADAM-10 con integrinas, se puede especular que la interacción inhibitoria entre $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17, podría ser la diferencia entre el procesamiento constitutivo y el procesamiento estimulado (Grotzinger et al., 2017).

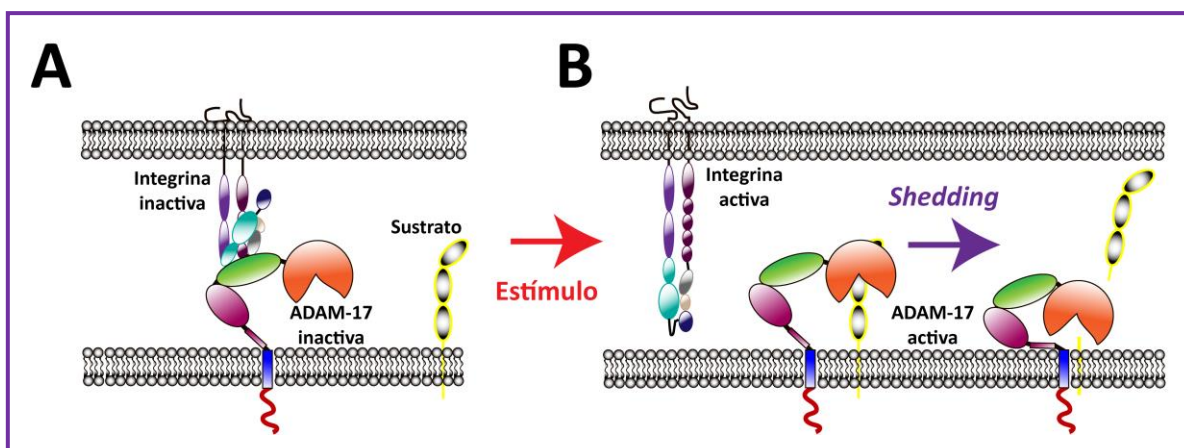


Figura 4. Interacción de ADAM-17 con la integrina $\alpha_5\beta_1$. El panel A representa la interacción de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con el dominio desintegrina de ADAM-17, manteniendo a la enzima inactiva (probablemente por impedimento estérico), por lo tanto, no accesible al sustrato susceptible de ser procesado. El panel B esquematiza cómo la activación de la integrina a través de un estímulo, conduce a la disociación del complejo integrina/enzima, activándose catalíticamente a ADAM-17 para procesar a sus sustratos (Modificada de Trad et al., 2013).

Bloqueo de la actividad proteasa

Teniendo en cuenta la implicación de ADAM-17 en la activación de diferentes proteínas de membrana y su relevancia en diferentes patologías, la búsqueda de inhibidores de ADAM-17 es objeto de intensa investigación (Figura 5). Existen diferentes abordajes experimentales para conseguir bloquear la actividad proteasa de los diferentes miembros de la familia de las ADAMs.

INTRODUCCIÓN

Estos incluyen el uso de inhibidores sintéticos de bajo peso molecular, formas purificadas o sintéticas de prodominios de las ADAMs (Wong et al., 2016), TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (Wisniewska et al., 2008), anticuerpos monoclonales (Mullooly et al., 2016; Peng et al., 2016) e inhibidores del transporte de ADAM-17 a la superficie celular. Hasta el momento, la mayoría de los estudios de los inhibidores sintéticos de bajo peso molecular finalizan en la fase I de ensayos clínicos por su falta de eficacia en el bloqueo *in vivo* (Akatsu et al., 2003; Murumkar et al., 2010). Existen cuatro miembros de la familia TIMP, todos ellos inhiben a las MMPs pero solo dos TIMP-1 y TIMP-3 inhiben a miembros de la familia de las ADAMs, concretamente TIMP-3 inhibe a: ADAM-12, ADAM-17, ADAM-19, ADAM-33 (Murphy, 2011). TIMP-3 es el único inhibidor fisiológico de ADAM-17 que se conoce que se une de manera no covalente al dominio catalítico con alta afinidad (Amour et al., 1998; Lee et al., 2005). ADAM-10, que comparte el 33% de aminoácidos con ADAM-17 (Matthews et al., 2016) es inhibido tanto por TIMP-1 como por TIMP-3, lo que es muy útil para diferenciar entre el corte mediado por ADAM-10 o ADAM-17.

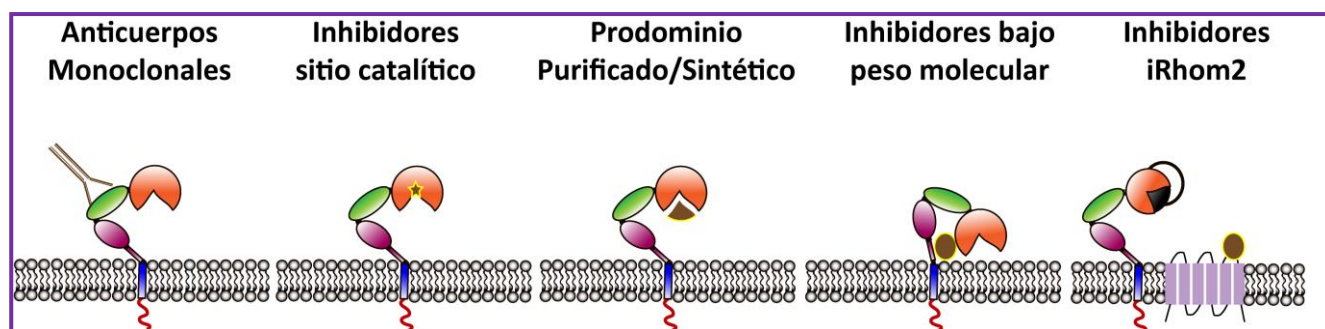


Figura 5. Estrategias orientadas a bloquear la actividad proteasa de ADAM-17. La expresión de la enzima se bloquea por vías transcripcionales o por silenciamiento de la expresión del RNAm pero para bloquear su funcionalidad se necesitan diferentes abordajes. A la izquierda se representa el mecanismo de acción de **anticuerpos monoclonales** específicos para ADAM-17 que neutralizan su actividad de *shedding*. **Los inhibidores del sitio catalítico**, o TIMPs, bloquean a ADAM-17 tanto en su forma madura como en la forma inmadura. **Las formas purificadas o sintéticas del prodominio** bloquean el sitio activo de la enzima. **Los inhibidores de bajo peso molecular** impiden la interacción de la enzima con los sustratos susceptibles de ser procesados. **Los inhibidores de iRhom2** bloquean la maduración de la enzima al no permitir su transporte desde el RE al Golgi (Modificada de Dreymueller and Ludwig, 2016).

El miembro de la familia romboide iRhom2 es necesario para el transporte de ADAM-17 en la superficie celular. Por lo tanto, se podrían desarrollar moléculas con la capacidad de bloquear la función de iRhom2 y así bloquear el transporte de ADAM-17 a la membrana celular (Lisi et al., 2014). Dado que la expresión de iRhom2 se restringe a las células inmunitarias, su inactivación no afecta a las funciones de ADAM-17 en otros tipos de células, con lo cual, iRhom2 puede

funcionar como un potencial fármaco dirigido a enfermedades inflamatorias (Bergbold and Lemberg, 2013).

Funciones

Los miembros pertenecientes a la superfamilia de las ADAMs son las principales proteínas transmembrana capaces de mediar la adhesión y la liberación proteolítica de moléculas de superficie celular. Por eso, se ha estudiado el papel que desempeñan en diferentes funciones celulares (desarrollo, inflamación, angiogénesis, fertilidad, patologías del sistema nervioso y cáncer).

Desarrollo

La inactivación de ADAM-17 por una delección en el dominio catalítico de la metaloproteasa en ratones *knock-out* (ratones ADAM-17 $\Delta Z_n/\Delta Z_n$), produce letalidad perinatal con anomalías graves en la piel y defectos adicionales en el cabello, el pulmón, el corazón y los tejidos epiteliales, demostrando la importancia de la actividad de ADAM-17 en el desarrollo (Peschon et al., 1998). Estudios previos demuestran cómo la delección de 4 pb en el exón 5 del gen que codifica para ADAM-17 desencadena inflamación de la piel, del intestino e infecciones recurrentes por virus (Blaydon et al., 2011), al expresarse ADAM-17 sin dominios funcionales (incluyendo el dominio catalítico). También se ha demostrado que ADAM-17 es importante en la homeostasis energética, puesto que, ratones con ADAM-17 catalíticamente inactivo desarrollan hipermetabolismo al disminuir su apetito, lo que hace que los animales sean extremadamente delgados (Gooz, 2010).

Inflamación

La función específica de ADAM-17 en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias es muy compleja y depende del contexto celular. ADAM-17 es la enzima responsable de cortar TNF- α , así que su implicación en enfermedades que cursan con niveles altos de TNF- α soluble es previsible. Se ha confirmado que la actividad de ADAM-17 está aumentada en pacientes con artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal o pulmonar, osteoartritis y en psoriasis (Lisi et al., 2014). No obstante, ADAM-17 también procesa otros sustratos, como moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas implicadas en la trans migración de leucocitos a focos de inflamación (ICAM-1), en la adhesión de leucocitos al endotelio activado en focos de inflamación (VCAM-1, *Vascular Adhesion Molecule-1*) y en la extravasación de monocitos a través de la barrera hematoencefálica (ALCAM, *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*) (Scheller et al., 2011). Para investigar el potencial terapéutico de ADAM-17 en la

inflamación es muy importante estudiar los diferentes mecanismos que regulan la actividad de ADAM-17.

Angiogénesis

ADAM-17 se expresa en células endoteliales (Gutierrez-Lopez et al., 2011), lo cual indica un posible papel de la enzima en la angiogénesis. En experimentos realizados *in vitro* con este tipo de células se ha observado que el *knock-down* de ADAM-17 provoca una inhibición de la proliferación y una disminución de la capacidad de invasión celular (Gooz et al., 2009). En estudios *in vivo* realizados en fetos de ratones que poseen una mutación en la actividad de ADAM-17, se confirma que la actividad de ADAM-17 es necesaria para remodelar los vasos preexistentes y para formar las redes de capilares (Canault et al., 2010).

Patologías del Sistema Nervioso Central

ADAM-17 ejerce un papel dual y contrapuesto en la enfermedad de Alzheimer. Por una parte, se expresa en la microglia y participa en la proteólisis del precursor amiloide, liberando un fragmento soluble no patogénico (a diferencia de la actividad de las β -secretasas que liberan el péptido amilogénico que genera las placas amiloides). Por otro lado la acción de la enzima genera factores inflamatorios que pueden agravar la neuroinflamación, evento crucial para el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Qian et al., 2015). En pacientes de esclerosis múltiple se pueden detectar niveles elevados de expresión de ADAM-17 en células mononucleares de sangre periférica (Seifert et al., 2002) y en linfocitos T que han invadido el sistema nervioso central (Moore and Crocker, 2012).

Cáncer

ADAM-17 está implicada en la desarrollo y progresión de múltiples tipos de cáncer al regular el crecimiento, la metástasis y la angiogénesis tumoral (Saftig and Reiss, 2011). Las evidencias que implican a ADAM-17 en la formación y progresión del cáncer son las siguientes: i) la expresión ectópica de ADAM-17 en diversas células cancerosas provoca un aumento de la invasión *in vitro* y un aumento de la proliferación y de la formación de tumores *in vivo* (Duffy et al., 2009a; McGowan et al., 2007); ii) existe una correlación directa entre el aumento de los niveles de ADAM-17 en diferentes tumores humanos y el aumento de los indicadores de progresión tumoral (tamaño, grado y metástasis en los ganglios linfáticos locales) (Duffy et al., 2009b). Por ello, ADAM-17 es potencialmente una diana farmacológica muy prometedora para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y se deben buscar inhibidores selectivos de esta metaloproteasa para crear terapias específicas (Mullooly et al., 2016).



OBJETIVOS

OBJETIVOS

En este trabajo de tesis nos hemos propuesto obtener herramientas de trabajo que permitan estudiar algunos de los mecanismos que regulan las principales actividades de ADAM-17. Para alcanzar este objetivo principal, nos planteamos los siguientes abordajes:

- 1.** Obtener anticuerpos monoclonales que reconozcan específicamente a ADAM-17 humano y que sean capaces de modular la funcionalidad de la enzima.
- 2.** Caracterizar los anticuerpos monoclonales obtenidos.
- 3.** Determinar los efectos funcionales de los anticuerpos monoclonales obtenidos sobre los principales procesos biológicos regulados por ADAM-17:
 - a.** Para medir su efecto sobre la capacidad adhesiva de ADAM-17, estudiaremos la interacción celular de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17.
 - b.** Para determinar si alteran su actividad proteolítica, analizaremos el procesamiento de corte y liberación de dos sustratos de ADAM-17 (ALCAM y TNF- α).

A vertical bar on the left side of the page with a gradient from light gray at the top to orange in the middle, and a small black square at the bottom.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

Las líneas celulares de epitelio de riñón de mono (COS-1), ovario de hámster chino (CHO), hibridoma de endotelio humano (EA-hy926), fibrosarcoma humano (HT1080) y adenocarcinoma de ovario humano (SKOV-3), se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Las líneas celulares humanas de linfocitos T (Jurkat y HSB2), linfocitos B (JY y Raji), las líneas monocíticas (THP-1 y U937), la línea eritroblastóide K562 y el carcinoma de colon Colo320, se cultivaron en medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*). La línea celular humana de adenocarcinoma de colon denominada LoVo, se cultivó en medio DMEM suplementado con el nutriente *Ham's F-12* (Gibco).

La diferenciación de la línea celular monocítica THP-1 hacia células de tipo macrófago, se estimuló con 100 ng/ml de PMA durante 24 horas a 37°C.

Todos los medios de cultivo citados se complementaron con 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco), 2 mM glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina. Las condiciones de crecimiento para todas las líneas celulares son una temperatura de 37°C en una atmósfera al 5 % de CO₂.

Anticuerpos

Para el desarrollo de la tesis, se utilizaron diversos anticuerpos monoclonales (AcMs) que reconocen nuestras moléculas de interés. Para detectar a ADAM-17 se obtuvieron en nuestro laboratorio dos AcMs denominados 2A10 (Gutierrez-Lopez et al., 2011) y YES-2. El Dr. Joachim Grötzinger (*Institute of Biochemistry, Christian-Albrechts-University, Olshausenstr, Kiel, Alemania*), nos proporcionó dos AcMs frente a ADAM-17, cuyos nombres son A300D y A300E (Trad et al., 2011). Para detectar la subunidad β_1 de las integrinas se usó el anticuerpo activador TS2/16 (Arroyo et al., 1992) y el anticuerpo inhibidor Lia 1/2 (Campanero et al., 1992); El AcM TS1/18, que reconoce la subunidad β_2 de las integrinas, se usó como anticuerpo bloqueante de su actividad (Dransfield et al., 1992). P1D6 es un anticuerpo inhibidor de la subunidad α_5 de las integrinas (Wayner et al., 1989). Los anticuerpos anti-CD9 que se emplearon son: VJ1/20 (Yanez-Mo et al., 1998) y PAINS-10 (Gutierrez-Lopez et al., 2003). PAINS-15 y 3B3 son AcMs específicos para ALCAM obtenidos en nuestro laboratorio (Gilsanz et al., 2013). Para reconocer ICAM-1 usamos el AcM MEM-111 (Leeuwenberg et al., 1992). También se utilizó el anticuerpo marcador de la activación de la subunidad β_1 de las integrinas denominado HUTS-21 (Luque et al., 1996).

Los anticuerpos monoclonales disponibles en nuestro laboratorio se purificaron a partir de líquido ascítico mediante cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G (Biovision), en función de su isotipo. En los casos que se necesitó, se biotinilaron los anticuerpos con biotina 3-sulfo-N-hidroxysuccinimida éster (Sigma-Aldrich) como se describió previamente (Luque et al., 1996).

Purificación de proteínas quiméricas

Para la purificación de las proteínas quiméricas **ADAM-17-Fc** (compuesta por los dominios extracelulares de ADAM-17 acoplados por el extremo carboxilo a la fracción constante (Fc) de la IgG humana) e **ICAM-1-Fc** (formada por los cinco dominios de ICAM-1 fusionados con la Fc de la IgG humana), se llevaron a cabo los protocolos descritos previamente (Bax et al., 2004; Berendt et al., 1992, respectivamente). Para obtener las proteínas secretadas al medio, se recogió el medio de cultivo de las células COS-1 transfectadas transitoriamente con ADAM-17, o el medio de cultivo de las células CHO-ICAM-1-Fc (expresan establemente ICAM-1-Fc), hasta llegar a un volumen de 500 ml aproximadamente. Se centrifugó el medio a 10.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C para eliminar restos celulares y se precipitaron las proteínas del sobrenadante con 31,3 g de sulfato amónico (Sigma) en polvo por cada 100 ml de sobrenadante de partida, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 12.000 r.p.m. 20 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado, que contiene la proteína quimérica entre otras proteínas, se resuspendió en 1 ml de 0,1 M Tris pH 7,8 por cada 100 ml de sobrenadante de partida y se dializó frente a 0,1 M Tris pH 7,8, 150 mM NaCl y 0,5 mM PMSF (*PhenylMethylSulfonyl Fluoride*, Sigma) durante toda la noche a 4°C, realizando 3 cambios de la solución de diálisis. A la mañana siguiente, se recogió el sobrenadante y se filtró para eliminar todos los agregados. Se preparó una columna de proteína A y se equilibró con 100 mM fosfato sódico, 1 mM EDTA (*EthyleneDiamineTetraacetic Acid*, Sigma) pH 7,8. A continuación se cargó el sobrenadante dos veces en la columna (uniéndose específicamente el Fc de la proteína a la proteína A) y se lavó con tampón de equilibrado, de tal forma que se eliminaron todas las impurezas del sobrenadante. A continuación, se eluyó con 0,1 M citrato sódico (Sigma) pH 3 y se recogieron alícuotas de 900 µl sobre 350 µl de Tris pH 9, para neutralizar el pH ácido y no desnaturalizar las proteínas. Tras la purificación de la proteína, se dializó frente a PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,4. Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm y se realizó una electroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) y *western-blot* con anticuerpos específicos para comprobar su integridad.

Generación y purificación de anticuerpos monoclonales frente a ADAM-17

Con el objetivo de conseguir anticuerpos específicos frente a ADAM-17, se realizó la técnica de obtención de anticuerpos monoclonales desarrollada en 1975 por los investigadores Georges Köhler y Cesar Milstein (Kohler and Milstein, 1975). Para ello, se completó un protocolo de inmunizaciones de 3 inyecciones intraperitoneales, en ratones hembras Balb/c de 7 semanas de edad, con la proteína quimérica ADAM-17-Fc. Las células del bazo extraídas se fusionaron con células SP2 (mieloma B murino), en presencia de PEG (*PolyEthylene Glycol*, Roche), que induce la fusión de las membranas plasmáticas y la formación de hibridomas celulares, que se repartieron en placas de cultivo multipocillos y se incubaron a 37°C. Para la selección de los hibridomas, se utilizó el medio HAT (*Hypoxanthine Aminopterin Thymidine*, Sigma-Aldrich), que selecciona exclusivamente aquellos híbridos procedentes de la fusión entre una célula de mieloma y una célula B, al poseer la capacidad de vivir indefinidamente (característica obtenida de las células de mieloma) y la capacidad de sintetizar guanina vía HGPRT (*Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosylTransferase*, obtenida de los linfocitos B). Posteriormente, se clonaron los hibridomas de interés por el método de dilución límite y se inyectaron intraperitonealmente en ratones Balb/c para obtener el líquido ascítico. Para la producción de líquido ascítico, se inyectaron intraperitonealmente 0,5 ml de pristán (Ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico, Sigma) a ratones hembras Balb/c de aproximadamente 9 semanas de edad. Después de 7 días, se inyectaron 1 millón de células del hibridoma clonado en crecimiento exponencial. El líquido ascítico se obtuvo por punción peritoneal a las dos semanas de inyectar el hibridoma. Se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante (generalmente presenta una concentración de 1 a 10 mg/ml del anticuerpo). A partir del líquido ascítico, se purificaron los anticuerpos por cromatografía de afinidad en una columna de proteína G-sepharosa usando tampón fosfato sódico 0,1 M pH 8 en los lavados, citrato sódico 0,1 M pH 3 en la elución y 1 M Tris pH 9 para neutralizar el pH después de la elución y alcanzar un pH final de 8 en las fracciones recogidas del anticuerpo. Tras la purificación, los anticuerpos se dializaron frente a PBS pH 7,4 y se comprobó su funcionalidad mediante ensayos de ELISA indirecto (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Plásmidos y transfecciones

La línea celular COS-1 se transfectó transitoriamente con 20 µg del vector de expresión que contiene el cDNA (*complementary DeoxyriboNucleic Acid*) de la proteína quimérica ADAM-17-Fc

(Bax et al., 2004) por electroporación a 250 V durante 30 ms en cubetas de 0,4 cm (electroporador: ElectroSquarePorator ECM830.BTX), de tal forma que la proteína se expresa y se secreta al medio de cultivo para recogerlo posteriormente.

Las líneas celulares HSB2 y U937, que no expresan CD9, se transfectaron con 20 µg del plásmido pcDNA3-CD9 (que contiene el cDNA codificante de la tetraspanina CD9) o con el plásmido pcDNA3 vacío como control (Invitrogen). Las transfecciones se realizaron mediante electroporación a 200 V (2 pulsos de 10 ms en cubetas de 0,4 cm). Las células transfectadas con estos plásmidos se seleccionaron con geneticina (Gibco) a 1 mg/ml y se analizaron por citometría de flujo (Reyes et al., 2015).

Para producir el silenciamiento de CD9 en la línea celular Jurkat, se utilizaron las siguientes construcciones de shRNA (*Short Hairpin RNA*): el plásmido TI356235 que contiene un shRNA específico para el silenciamiento de CD9 (Jurkat shCD9) y el plásmido control TR20003 que no contiene ningún inserto (Jurkat TR2). Estos plásmidos se introdujeron en las células Jurkat mediante infección por retrovirus siguiendo las instrucciones del fabricante (OriGene Technologies). Las células infectadas se seleccionaron con 1 µg/ml de puromicina (Sigma) y se analizaron por citometría de flujo (Gutierrez-Lopez et al., 2011).

La línea celular Raji, negativa para CD9, se transfectó establemente con el cDNA de CD9 insertado en el plásmido pcDNA3 mediante electroporación a 300 V durante 22 ms con 20 µg del plásmido y las células transfectadas se seleccionaron con geneticina a 0,8 mg/ml. Los clones se analizaron por citometría de flujo y se mantuvieron en RPMI-1640 suplementado con 0,2 mg/ml de geneticina (Gutierrez-Lopez et al., 2011).

La línea de carcinoma de colon humano Colo320, negativa para CD9, se transfectó por electroporación a 165 V durante 70 ms con 20 µg del cDNA codificante para CD9 o el vector vacío pcDNA3 como control. Los clones positivos se seleccionaron con geneticina a 0,8 mg/ml y se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con 0,2 mg/ml de geneticina (Ovalle et al., 2007).

Ensayos de ELISA

En los ensayos de **ELISA indirectos**, se inmovilizaron en placas multipocillos de fondo plano 5 µg/ml de las siguientes proteínas: ADAM-17-Fc, ICAM-1-Fc y tres dominios purificados de ADAM-17 (desintegrina, dominio próximo a la membrana y la construcción que incluye ambos dominios, cedidos por el Dr. Joachim Grötzinger) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se descartó el contenido de los pocillos y se bloquearon con 1 % de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma) en PBS (hervida 1 minuto y filtrada para evitar agregados), durante 1 hora a

temperatura ambiente. A continuación, se eliminó de nuevo el contenido de los pocillos, se lavaron con 0,5 % Tween-20 (Sigma) en PBS y se incubaron con 10 µg/ml de AcMs diluidos en 0,2 % BSA en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó y se lavó de nuevo varias veces la placa, para posteriormente incubarla con un anticuerpo secundario específico de ratón acoplado a la peroxidasa de rábano (Sigma), durante 1 hora a temperatura ambiente.

En los **experimentos de intercompetición de los AcMs 2A10 y YES-2**, se inmovilizó en placas de fondo plano 5 µg/ml ADAM-17-Fc, diluido en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se bloquearon los pocillos con 1 % de BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se descartó el contenido de los pocillos, se lavaron con 0,5 % Tween-20 (Sigma) en PBS y se incubaron los AcMs sin biotinar diluidos en 0,2 % BSA en PBS a una concentración de 10 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente y, sin retirar los reactivos, se añadieron 10 µg/ml de los AcMs biotinilados en la misma solución anterior. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se lavó la placa con 0,5 % Tween-20 en PBS y se incubó con estreptavidina acoplada a la peroxidasa de rábano (Sigma).

El ensayo de **ELISA sándwich** para detectar el sustrato soluble TNF-α se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Immunotools). En el caso del sustrato soluble ALCAM, se inmovilizó 10 µg/ml del anticuerpo de captura (PAINS-15) en la placa multipocillos, diluido en PBS, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se descartó, se lavó y se bloqueó la placa como se ha descrito anteriormente. Después de 1 hora, se lavó de nuevo y se incubó con los sobrenadantes de cultivo durante 2 horas a temperatura ambiente. Los sobrenadantes recolectados son de las líneas celulares que se estimularon previamente con 200 ng/ml de PMA (Sigma) y se incubaron en presencia de 10 µg/ml de AcMs, durante 24 horas a 37°C. A continuación, se lavó la placa y se incubó con el anticuerpo de detección (3B3 biotinilado) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalizado el periodo de incubación, se descartó el contenido de la placa multipocillos, se lavó y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina acoplada a la peroxidasa de rábano (Sigma).

Para **determinar el isotipo de los AcMs**, se utilizó el Kit *Hibridoma Subisotyping for Mouse* (Calbiochem) siguiendo el protocolo del fabricante.

En todos los experimentos de ELISA al finalizar la incubación con el reactivo acoplado a la peroxidasa de rábano, se lavaron los pocillos y se añadió 40 mg del sustrato enzimático OPD (*O-Phenylenediamine Dihydrochloride*, Sigma) diluido en solución para revelar (0,2 M NaHPO₄ + 0,1 M ácido cítrico + 40 µL peróxido de hidrógeno al 30 % en 10 ml de agua) y se incubó durante

el tiempo necesario para que se produzca la reacción enzimática, que posteriormente se detuvo con una solución 0,25 M HCl (Panreac Applychem). Finalmente, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Tecan GENios).

Detección de ALCAM y TNF- α soluble

Para aumentar la liberación de determinados sustratos de ADAM-17 (ALCAM y TNF- α), se cultivaron 1×10^6 células por punto de las líneas celulares JY y THP-1, en presencia/ausencia de 200 ng/ml de PMA durante 24 horas a 37°C. Para estudiar el efecto de los anticuerpos anti-ADAM-17 en el procesamiento de sus sustratos, además del PMA, se añadieron 10 μ g/ml de cada anticuerpo de interés al medio de cultivo de las líneas celulares seleccionadas. En todos los casos, la cantidad de sustrato soluble en el medio se cuantificó mediante ELISA de sándwich siguiendo el protocolo explicado anteriormente. Se consideró el 100 % a la cantidad de ALCAM o TNF- α liberada por las células control tratadas únicamente con PMA. La cuantificación del sustrato liberado se realizó con la ayuda de una recta patrón con concentraciones conocidas de cada uno de los sustratos.

Citometría de flujo

En los **marcajes realizados para analizar la expresión de proteínas en la superficie celular**, las células se lavaron dos veces con PBS y se usaron 2×10^5 células por punto. Se incubaron 30 minutos a 4°C con anticuerpos primarios (10 μ g/ml) en RPMI-1640. A continuación, se lavaron dos veces con RPMI-1640 y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con diferentes anticuerpos secundarios: el anticuerpo específico anti-IgG de humano (Sigma) acoplado a FITC (*Fluorescein IsoTioCyanate*, Sigma), el anticuerpo específico anti-IgG de ratón (Sigma) acoplado al fluorocromo Alexa Fluor-647 (Sigma), o estreptavidina acoplada al fluorocromo Alexa Fluor-488 (Sigma). Después, se volvieron a lavar las células dos veces y se fijaron con 2 % de formaldehído (Sigma) en PBS durante 10 minutos a 4°C. En el caso de las líneas celulares THP-1 y U937, antes de añadir el anticuerpo primario, se saturaron los receptores Fc de la superficie celular con gammaglobulina humana (Sigma) durante 20 minutos a 4°C. En determinados experimentos se estimularon las células con 100 ng/ml de PMA durante 24 horas a 37°C antes del marcaje. En los experimentos que se necesitó, se incubaron previamente las células durante 1 hora a 37°C con: 3 mM y 25 mM de NAC (*N-Acetyl-L-Cysteine*, Sigma), 7 mM de DTT (Sigma), 500 μ M de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno, Foret) y 5 μ g/ml de Citocalasina D (Sigma-Aldrich).

Para los **marcajes intracelulares**, se fijaron las células previamente con formaldehído al 1 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente, se lavaron las células dos veces con TBS (*Tris Buffered Saline*). A continuación, se permeabilizaron con 1 % Tritón-X-100 (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las células con PBS. Para bloquear las uniones inespecíficas, se utilizó 1 % de BSA diluida en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, se siguió el mismo protocolo al marcaje de superficie descrito anteriormente.

Para analizar por **citometría la activación de la expresión** de la subunidad β_1 de las integrinas, las células se lavaron con tampón HEPES (4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid)) que contiene: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mg/ml glucosa en agua. A continuación, las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con 200 ng/ml de PMA, en presencia de los diferentes estímulos: 200 μ M Mn^{2+} o 1 mM EDTA. Posteriormente, se añadieron los distintos anticuerpos (10 μ g/ml) durante 1 hora a 37°C. Después, las células se lavaron tres veces con tampón HEPES, se incubaron durante 20 minutos a 37°C con el anticuerpo HUST-21 biotinilado (10 μ g/ml). Al finalizar la incubación, las células se lavaron tres veces con tampón HEPES, se incubaron durante 20 minutos a 4°C con estreptavidina acoplada al fluorocromo Alexa Fluor-488 y se volvieron a lavar.

En todos los experimentos de citometría, la intensidad de fluorescencia de los distintos marcajes celulares se analizó en un citómetro de flujo FACScalibur TM (Beckton-Dickinson) y los datos se procesaron con el programa de análisis FlowJo (Tree Star Inc.).

Preparación de extractos de proteína y análisis por western-blot

La expresión de ADAM-17 en distintas líneas celulares, se analizó mediante la técnica de *western-blot*. Primero se lisaron las células 15 minutos a 4 °C en tampón de lisis Tritón (1 % Tritón-X-100; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,5 mM $CaCl_2$; 1 mM $MgCl_2$; 1 mM PMSF; 0,2 U/ml aprotinina; 2 μ g/ml leupeptina y 1 μ g/ml pepstanina). A continuación, los lisados fueron clarificados por centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. Las muestras se prepararon en tampón de carga Laemmli en condiciones reductoras. Las muestras de proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 8 %. Posteriormente, se realizó una transferencia líquida de las proteínas fraccionadas a una membrana de nitrocelulosa (*Pall Life Sciences*). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora con 3 % BSA preparada en TBS y se incubaron con el anticuerpo específico para ADAM-17 (AcM A300D), durante toda la noche en TBS con 0,3 % BSA a la dilución optimizada previamente. Tras lavar las membranas con tampón de lavado (TBS con 0,1 % Tween-20), las

membranas se incubaron con el anticuerpo secundario específico de ratón acoplado a la peroxidasa de rábano, durante 1 hora y se volvieron a lavar. El revelado se realizó utilizando el sistema quimioluminiscente de Amersham y la señal quimioluminiscente se visualizó con el lector *ImageQuant* LAS 4000 mini (GE).

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos celulares, se utilizó el kit *DC protein assay* (Bio-Rad *Laboratories*) y se midió la absorbancia a 690 nm. Las concentraciones se estimaron a partir de una curva patrón construida con distintas concentraciones de BSA (Fracción V).

Ensayos de inmunoprecipitación de proteínas

Las células THP-1 se estimularon con 100 ng/ml de PMA 24 horas a 37 °C y al día siguiente se lisaron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas) con el detergente Tritón-X-100 al 1 % y se centrifugaron los lisados para eliminar el material insoluble. A continuación, se incubaron las células con el anticuerpo 2A10 y YES-2 (10 µg/ml) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4 °C con proteína A-sefarosa (20 µl por punto). Al día siguiente, se lavó el material inmunoprecipitado 3 veces con tampón de lisis diluido 1/5 y se prepararon las muestras en tampón de carga Laemmli en condiciones reductoras. Los complejos inmunoprecipitados se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida del 8 % y se detectó la presencia ADAM-17 con el AcM A300D por *western-blot* como se ha indicado anteriormente.

Ensayos de adhesión celular

Para los experimentos de **adhesión celular a ADAM-17-Fc**, se inmovilizó 5 µg/ml de ADAM-17-Fc diluido en PBS en placas multipocillos de fondo plano, durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente para evitar uniones inespecíficas, se bloquearon los pocillos con 1 % BSA en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizaron 2x10⁵ de células por punto y se estimularon con 200 ng/ml de PMA durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína-acetoximetil éster), Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células marcadas se diluyeron en tampón de adhesión (20 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl, 2 mg/ml glucosa y 0,2 mM Mn²⁺) y se repartieron 2 x 10⁵ células por cada pocillo, en presencia o ausencia de 10 µg/ml de los siguientes anticuerpos: anti-ADAM-17 (2A10 y YES-2), anti-ICAM-1 (MEM-111), anti-β₁ (Lia 1/2) o anti-α₅ (P1D6). Tras 15 minutos a 4°C, para permitir que las células se depositen en el fondo de los pocillos y que los anticuerpos se unan a sus antígenos, las células se incubaron 60 minutos a

37°C para permitir su adhesión. Antes de lavar con tampón de adhesión atemperado a 37°C para cuantificar las células que quedaron adheridas, se cuantificó la fluorescencia en un lector de placas y este valor de la fluorescencia total, se utilizó como 100 % de adhesión.

En los experimentos de **adhesión a fibronectina** (Sigma), se inmovilizó 5 µg/ml de fibronectina en PBS en placas multipocillos de fondo plano, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se bloquearon los pocillos con 1% BSA en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se estimularon con 100 ng/ml de PMA durante 1 hora a 37°C y posteriormente se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM. Las células marcadas se diluyeron en tampón de adhesión con 50 µM de Mn^{2+} y se repartieron 2×10^5 células por cada pocillo, en presencia o ausencia de 10 µg/ml de los anticuerpos. Tras 15 minutos a 4°C, se incubaron 75 minutos a 37°C para permitir la adhesión. En los casos que fue necesario, el lavado se realizó sumergiendo la placa 20 minutos en PBS a 37°C de forma que la placa quedó boca abajo y las células no adheridas se separaron por gravedad. Después del lavado se volvió a medir la fluorescencia de las células que quedaron adheridas.

Para realizar las **adhesiones pre-incubando con los anticuerpos a la proteína quimérica ADAM-17-Fc**, después de eliminar la solución de bloqueo de la placa, se añadieron 10 µg/ml de los AcMs Lia1/2, MEM-111, YES-2 y 2A10, diluidos en tampón de adhesión, durante 1 hora a 4°C. Al finalizar el tiempo de incubación, se lavaron los pocillos con PBS para retirar el exceso de anticuerpo no unido y se añadieron las células marcadas con la sonda para permitir su adhesión. En el caso de las **adhesiones en las que sólo las células se trataron con los anticuerpos**, después de marcar las células con la sonda fluorescente, se incubaron con los AcMs durante 30 minutos a 4°C. Para ello, se añadieron las células a una placa multipocillos de fondo redondo y se trataron con 10 µg/ml de los AcMs diluidos en tampón de adhesión. Después, se lavaron las células con PBS y se añadieron a la placa donde está inmovilizado el sustrato para permitir la adhesión.

Para trabajar en un contexto patológico, se utilizó un **modelo de adhesión de células tumorales a monocapas de células endoteliales**. Para ello, se recubrieron las placas de cultivos de 96 pocillos con 2×10^4 de células EA-hy926 (hibridoma de células endoteliales HUVEC y adenocarcinoma de pulmón A472) por cada punto y se realizaron ensayos de adhesión celular de las células humanas tumorales Colo320 y SKOV-3, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Previamente a la adhesión, la monocapa formada por las EA-hy926 en cada pocillo, se fijó durante 10 minutos con 1 % de formaldehído en PBS a temperatura ambiente y después, se lavaron las células fijadas con TBS y con PBS. No obstante, no se trataron las células ni con PMA ni con estímulos para activar a las integrinas, es decir, las células se diluyeron en medio de cultivo DMEM (para intentar reproducir las condiciones fisiológicas celulares), que

también se usó para lavar las células. Finalmente, se cuantificaron las células que quedaron adheridas a las EA-hy926.

Análisis estadístico

En el estudio estadístico se utilizó el análisis de varianza simple (*ANOVA*) con el programa SPSS (IBM). Para las comparaciones múltiples, se llevaron a cabo pruebas post-hoc y cuando se cumplió la homocedasticidad, se realizó el test de Bonferroni. Existen diferencias significativas cuando el nivel de significación es igual o menor a 0,05 ($p < 0,05$).



RESULTADOS

RESULTADOS

Obtención de anticuerpos monoclonales frente a ADAM-17

Con el objetivo de generar anticuerpos monoclonales (AcMs) específicos frente a ADAM-17 humano, hemos inmunizado ratones Balb/c con la proteína quimérica ADAM-17-Fc que contiene todos los dominios extracelulares de ADAM-17 fusionados a la fracción constante (Fc) de la IgG humana), siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (**Figura 6**).

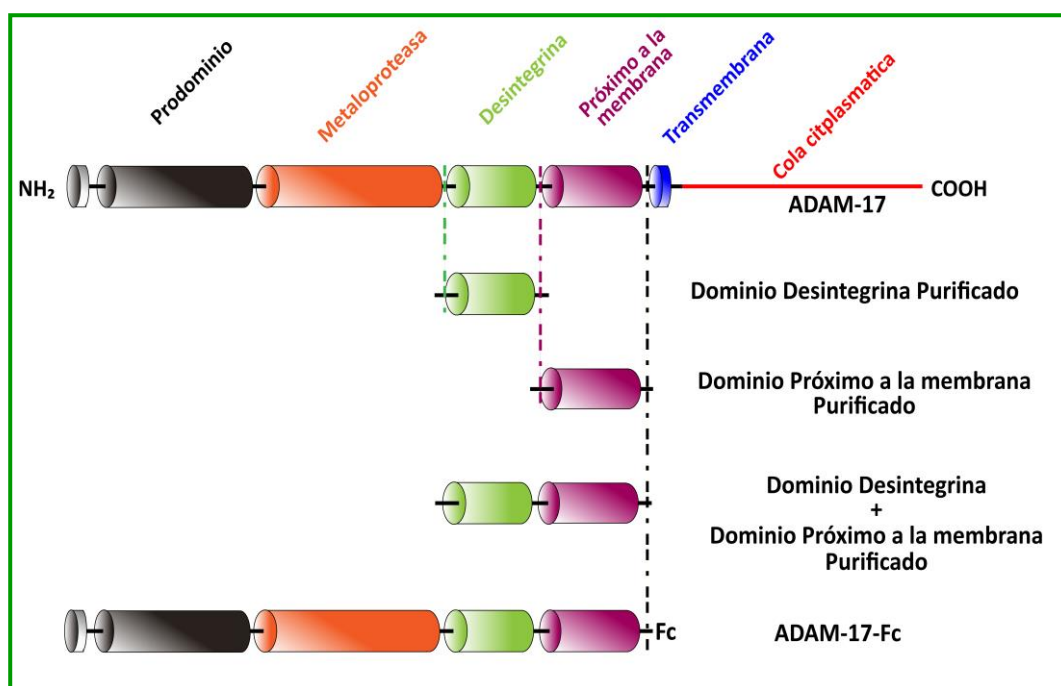


Figura 6. Construcciones purificadas de ADAM-17 humano. En la imagen se detallan los dominios que contienen las construcciones utilizadas para la obtención y caracterización de los AcMs generados específicamente frente a ADAM-17. En la parte superior de la imagen se muestra el esquema lineal de la estructura de ADAM-17.

Posteriormente, se fusionaron las células del bazo de los ratones inmunizados con células de la línea de mieloma SP2 para obtener hibridomas celulares, que se distribuyeron en placas de cultivo de 96 pocillos. Después de 7 días en cultivo, recolectamos los sobrenadantes de los hibridomas para analizar, mediante ensayos de ELISA indirectos, la presencia de AcMs con reactividad positiva frente a ADAM-17-Fc. Obtuvimos dos AcMs que reaccionaban eficientemente con ADAM-17-Fc, que denominamos 2A10 y YES-2 (**Figura 7 panel A**). Para descartar que estos AcMs estuvieran reconociendo la región Fc de la proteína quimérica, realizamos ensayos de ELISA indirectos, inmovilizando otra proteína quimérica diferente a

RESULTADOS

ADAM-17, que también se encuentra fusionada a la Fc de IgG humana (ICAM-1-Fc). Observamos que los AcMs 2A10 y YES-2 no son reactivos frente a ICAM-1-Fc, por lo que no están reconociendo la región Fc (**Figura 7 panel B**). Una vez seleccionados los AcMs, quisimos determinar el isotipo de cada uno de ellos para poder purificarlos de forma eficiente. Con este objetivo utilizamos el Kit comercial *Hybridoma Subisotyping for Mouse* (Calbiochem). Como se puede observar en la **Figura 7C**, el isotipo de ambos AcMs, 2A10 y YES-2, es IgG_{2a}.

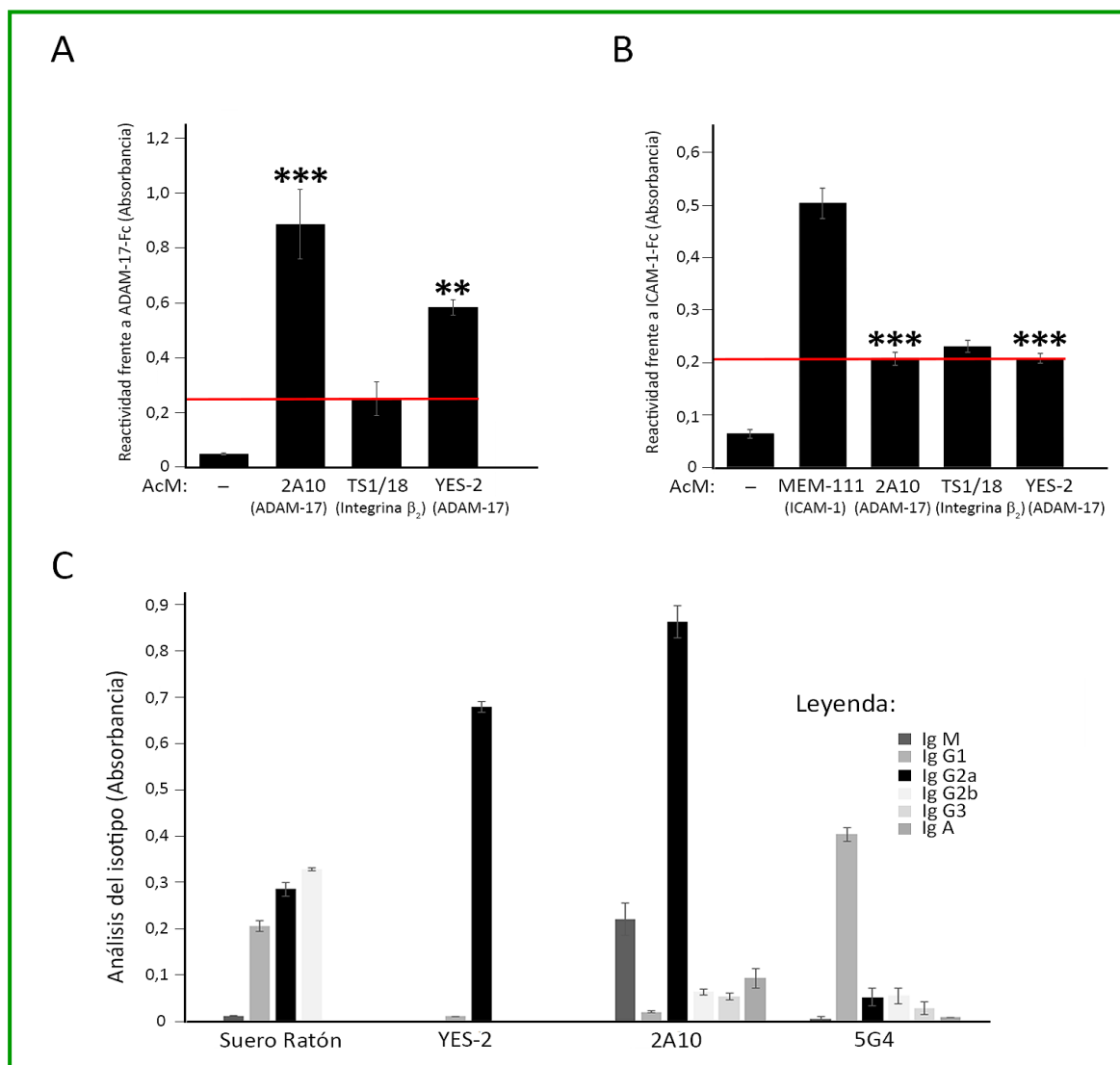


Figura 7. Selección e isotipaje de AcMs específicos frente a ADAM-17. A) Análisis de la reactividad positiva de los AcMs 2A10 y YES-2 con la proteína quimérica ADAM-17-Fc mediante ELISA indirecto. B) Análisis mediante ELISA indirecto de la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2 con la proteína quimérica ICAM-1-Fc. Como control negativo de los experimentos se usó un anticuerpo frente a la subunidad β_2 de las integrinas (AcM TS1/18). **C) Análisis del isotipo de los AcMs 2A10 y YES-2.** Como control positivo se usó el suero de ratón y como control positivo específico de un isotipo, se usó el AcM denominado 5G4 que se une específicamente a ADAM-17 y que presenta el isotipo IgG₁. Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Caracterización de los anticuerpos monoclonales 2A10 y YES-2

Análisis de los epítodos de unión de los AcMs 2A10 y YES-2 a ADAM-17

Una vez seleccionados los AcMs específicos frente a ADAM-17, quisimos conocer los dominios de ADAM-17 que reconocen cada uno de los AcMs (**Figura 8**). Para ello, realizamos ensayos de ELISA indirectos inmovilizando tres dominios purificados de ADAM-17: el dominio desintegrina, el dominio próximo a la membrana y la construcción que abarca el dominio desintegrina más el dominio próximo a la membrana (**Figura 6**). Observamos que los AcMs 2A10 y YES-2 se unen solamente a la construcción que contiene el dominio desintegrina de ADAM-17, no uniéndose al dominio próximo a la membrana ni tampoco a la construcción que abarca ambos dominios. Sin embargo, dos AcMs controles dirigidos frente a ADAM-17 que reconocen específicamente el dominio desintegrina (AcM A300D) o el dominio próximo a la membrana (AcM A300E), sí son capaces de unirse a la construcción que contiene ambos dominios. Estos datos sugieren que los epítodos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2 en el dominio desintegrina de ADAM-17 pueden ser conformacionales, puesto que sólo reconocen muy débilmente la construcción que contiene los dominios desintegrina y el próximo a la membrana, pese a unirse robustamente al dominio desintegrina purificado.

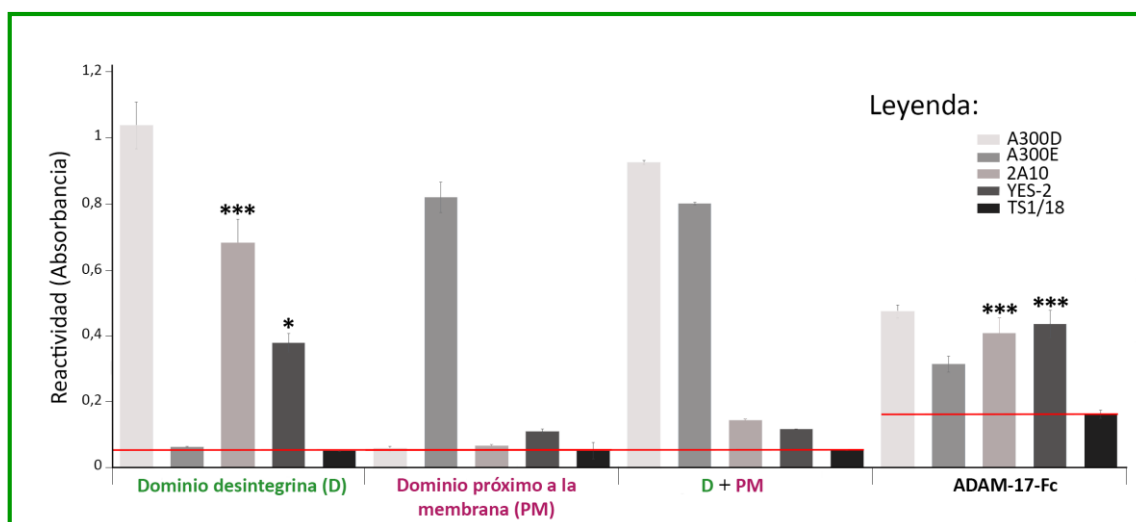


Figura 8. Mapeo de los dominios de unión de los AcMs 2A10 y YES-2. Se llevaron a cabo ensayos de ELISA indirectos inmovilizando tres ectodominios purificados de ADAM-17 (desintegrina, próximo a la membrana y la construcción que abarca ambos dominios) o la proteína quimérica ADAM-17-Fc (contiene todos los dominios extracelulares de ADAM-17). Como controles positivos de los experimentos se utilizaron anticuerpos anti-ADAM-17 que reconocen únicamente el dominio desintegrina o el dominio próximo a la membrana (AcMs A300D y A300E, respectivamente) y como control negativo un anticuerpo anti-integrina β_2 (AcM TS1/18). Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. * $p<0,05$ y *** $p<0,001$.

RESULTADOS

Continuando con la caracterización de los epítomos, decidimos llevar a cabo experimentos de unión competitiva entre los dos AcMs 2A10 y YES-2 (**Figura 9**). En estos ensayos observamos que, tal y como se esperaba, se produce la máxima competición cuando estos dos AcMs compiten consigo mismos y que no existe intercompetición alguna cuando incubamos con un AcM que no reconoce a ADAM-17, como es el anticuerpo frente a la subunidad β_1 de las integrinas (AcM Lia 1/2). Por tanto, la autocompetición y la falta de competición con un AcM específico frente a una molécula no relacionada, sirven como controles positivo y negativo, respectivamente, de este tipo de ensayos. Cuando incubamos primero la construcción ADAM-17-Fc inmovilizada sobre soporte plástico con el AcM YES-2 observamos que intercompite parcialmente con el AcM 2A10, mientras que cuando incubamos primero con el AcM 2A10 se produce una intercompetición total (del mismo nivel que la autocompetición) con el AcM YES-2.

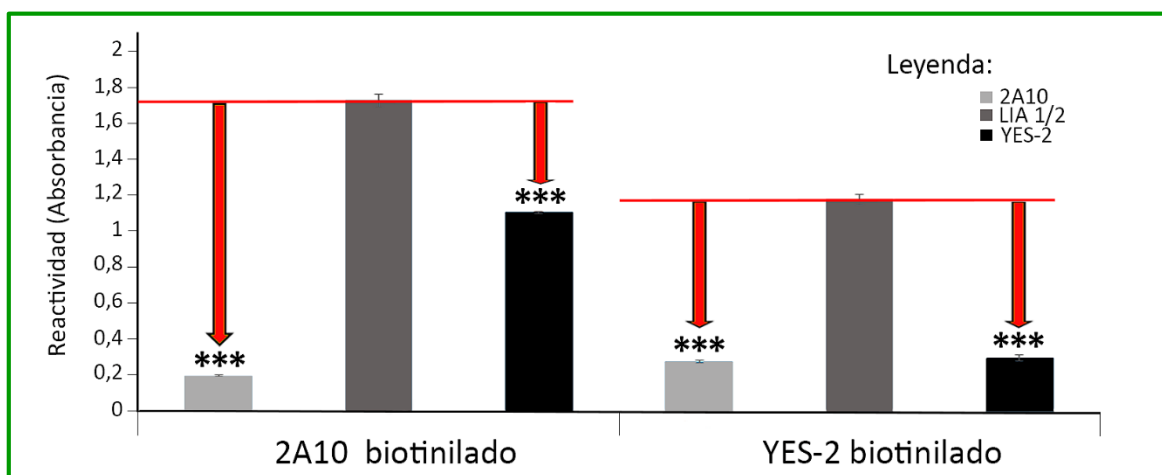


Figura 9. Experimentos de intercompetición entre los AcMs 2A10 y YES-2. Estos ensayos consisten en inmovilizar en placas multipocillos 5 $\mu\text{g/ml}$ de ADAM-17-Fc, incubar posteriormente con los AcMs sin biotinilar y, sin retirar los reactivos, añadir los AcMs biotinilados para secuencialmente incubar con un reactivo que reconoce la biotina (estreptavidina) acoplado a la peroxidasa de rábano. El punto donde se observa máxima intercompetición se produce cuando los AcMs compiten consigo mismos y no existe intercompetición cuando usamos un anticuerpo frente a la subunidad β_1 de las integrinas (AcM Lia 1/2). Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos en estos experimentos de intercompetición de los AcMs sugieren que los epítomos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2 están muy próximos y se solapan parcialmente y además que el AcM 2A10 posee una mayor afinidad de unión a su epítopo en el dominio desintegrina de ADAM-17-Fc y por lo tanto desplaza parcialmente al AcM YES-2 previamente unido. Otra posibilidad alternativa para explicar estos resultados es que la unión

del AcM 2A10 altere la conformación espacial de ADAM-17-Fc de tal manera que ocurra un ocultamiento del epítipo (*epitope masking/burial*) reconocido por el AcM YES-2.

Estudio de la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2 por citometría de flujo.

Para analizar la reactividad de nuestros AcMs específicos frente a ADAM-17 en la superficie celular, utilizamos distintas líneas celulares, ya que ADAM-17 es una molécula muy ubicua expresada en prácticamente todos los tipos celulares (Ebsen et al., 2013). En la **Figura 10** representamos los perfiles de expresión de los epítipos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2 mediante análisis por citometría de flujo de líneas celulares leucocitarias humanas sin permeabilizar: linfocitos T (Jurkat), linfocitos B (JY), eritroblatoides (K562) y monocíticas (THP-1). Lo más llamativo es que el AcM 2A10 es más reactivo que el AcM YES-2 en todas las líneas celulares leucocitarias analizadas.

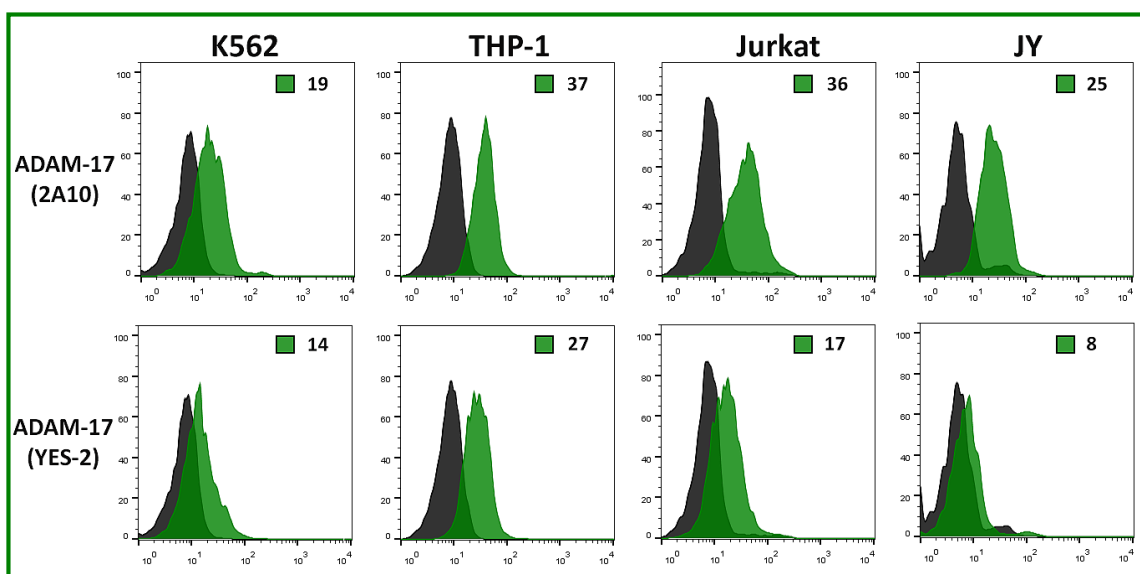


Figura 10. Análisis por citometría de flujo de la expresión de los epítipos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2 en la superficie celular de líneas leucocitarias humanas (K562, THP-1, Jurkat y JY). El histograma de color negro, representa la expresión del control negativo y el histograma de color verde muestra la expresión del respectivo epítipo de ADAM-17 en la superficie de las distintas líneas celulares. Los números indicados en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia.

También analizamos la expresión de estos dos epítipos mediante citometría de flujo en diferentes líneas tumorales no leucocitarias humanas (sin permeabilizar) (**Figura 11**): colocalcarinoma (Colo320), fibrosarcoma (HT1080), adenocarcinoma de ovario (SKOV-3) y adenocarcinoma de colon (LoVo). En casi todas las líneas tumorales obtenemos resultados similares a los obtenidos en las líneas leucocitarias, es decir, la expresión del epítipo reconocido por el AcM 2A10 en la superficie celular era mayor que la obtenida con el AcM YES-2. La única

línea celular humana en la que observamos una mayor expresión del epítipo que reconoce el AcM YES-2, siendo incluso más reactivo que el propio 2A10, es en LoVo, un adenocarcinoma de colon deficiente en Furina (principal proconvertasa encargada del procesamiento proteolítico del prodominio de ADAM-17).

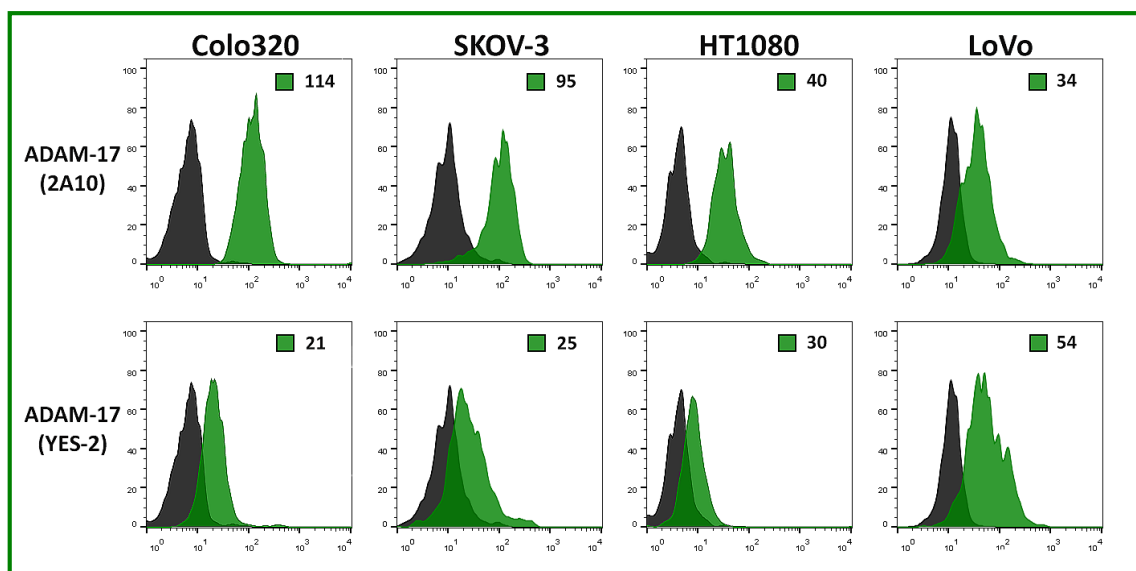


Figura 11. Estudio por citometría de flujo de la expresión de los epítipos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2, en la superficie de líneas celulares tumorales humanas (Colo320, SKOV-3, HT1080 y LoVo). El histograma de color negro, representa la expresión del control negativo y el histograma de color verde muestra la expresión de ADAM-17. Los números incluidos en el interior del gráfico reflejan el valor de la intensidad media de fluorescencia.

Como se ha mencionado previamente, la forma inmadura de ADAM-17 apenas se localiza en la superficie celular (Lorenzen et al., 2016). Por ello, en un primer momento pensamos que la deficiencia de Furina en la línea celular LoVo podría causar un aumento de la expresión en la superficie celular de la forma inmadura de ADAM-17. De este modo, el AcM YES-2 sería más reactivo solamente en esta línea celular porque la expresión de su epítipo en el dominio desintegrina de ADAM-17 sería dependiente de la presencia del prodominio. Con este objetivo, permeabilizamos la membrana plasmática de las líneas celulares JY y Colo320 (Figura 12) para acceder al reservorio intracelular de ADAM-17, compuesto tanto por la forma madura como por la inmadura, habiendo una mayor proporción de forma inmadura que en la superficie celular. Obtuvimos que, al permeabilizar la membrana plasmática, aumentaba la reactividad del AcM YES-2, es decir, aumenta la expresión del epítipo reconocido por este AcM. Lo contrario sucede para el AcM 2A10, ya que en condiciones de permeabilización disminuye su reactividad.

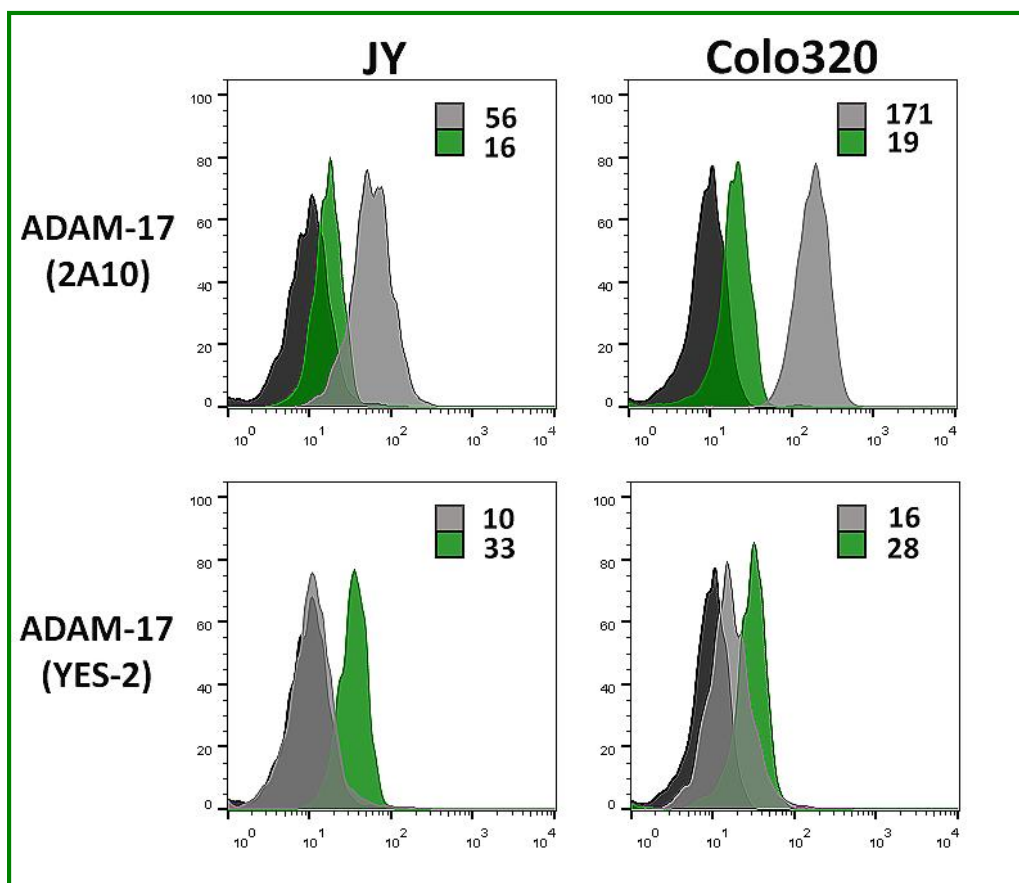


Figura 12. Análisis de la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2 en condiciones de permeabilización de la membrana plasmática en líneas celulares humanas (JY y Colo320). El histograma de color negro representa la expresión del control negativo, el histograma de color verde muestra el nivel de expresión de ADAM-17 al permeabilizar la membrana plasmática y el histograma de color gris representa la expresión de ADAM-17 en la superficie celular (células sin permeabilizar). Los números incluidos en cada gráfico muestran los valores de la intensidad media de fluorescencia.

Los datos obtenidos para el AcM YES-2, muestran que su reactividad aumenta al permeabilizar la membrana plasmática y permitir el acceso al *pool* intracelular de ADAM-17, lo que puede indicar que la presencia del prodominio sea necesaria para la expresión de este epítipo. Para comprobar esta hipótesis, decidimos llevar a cabo experimentos de inmunoprecipitación con el objetivo de determinar si el AcM YES-2 reconoce la forma inmadura y/o si el AcM 2A10 reconoce exclusivamente a la forma madura de ADAM-17 (Figura 13). Al inmunoprecipitar con el AcM 2A10, obtenemos un perfil de dos bandas que corresponden a las formas madura (peso molecular de aproximadamente 100 kDa) e inmadura (de aproximadamente 130 kDa) de ADAM-17, por lo que podemos descartar que el AcM 2A10 se una específicamente a la forma madura de ADAM-17. En el caso del AcM YES-2, que inmunoprecipita ADAM-17 con menor eficiencia que el AcM 2A10, se obtiene una banda en el

RESULTADOS

western-blot que se corresponde con la forma madura de ADAM-17, por lo tanto, la unión a ADAM-17 del AcM YES-2 no depende de la presencia del prodomino (no se detecta la banda que corresponde a la forma inmadura de aproximadamente 130 kDa).

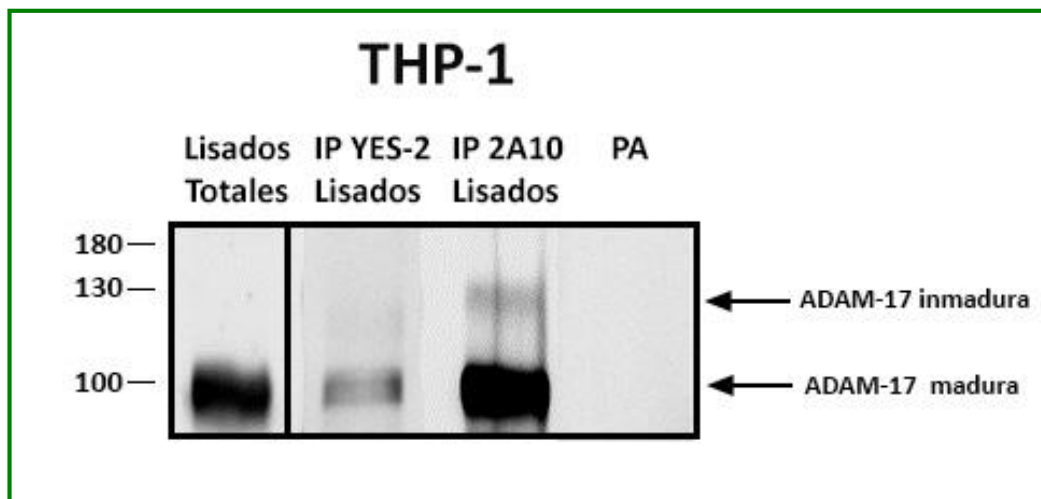


Figura 13. Inmunoprecipitaciones con los AcMs YES-2 y 2A10, en la línea celular THP-1. Las células se estimularon con 100 ng/ml de PMA durante 24 horas a 37 °C. Al día siguiente, las células se lisaron con un tampón de lisis que contenía detergente Tritón-X-100 al 1 % y, a continuación, se incubaron con los AcMs inmunoprecipitantes YES-2 y 2A10. La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante *western-blot* con el anticuerpo específico para el dominio desintegrina de ADAM-17 denominado A300D. Los pesos moleculares en kDa se indican a la izquierda del panel. Las flechas negras indican las bandas correspondientes a la forma madura de ADAM-17 (100 kDa) y a la forma inmadura (130 kDa). PA: proteína A-sefarosa sin anticuerpo unido.

Continuando con el estudio de la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2, decidimos realizar diferentes abordajes con el objetivo de intentar modificar la expresión de los epítomos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2 en ADAM-17, y así averiguar a qué se debe la distinta reactividad que habían mostrado los anticuerpos. Para ello, estudiamos los efectos de la presencia/ausencia de la tetraspanina CD9, estimulación con ésteres de forbol, cambios conformacionales de la estructura terciaria de ADAM-17 y modificación del tráfico intracelular dependiente del citoesqueleto de actina. En primer lugar, decidimos estudiar el efecto de la presencia o ausencia de CD9, al existir diferentes trabajos de investigación, que han identificado específicamente a miembros de la familia de las tetraspaninas como moduladores de la actividad de las ADAMs (Arduise et al., 2008; Yanez-Mo et al., 2011). Concretamente, apoyándonos en los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Gutierrez-Lopez et al., 2011), y confirmados posteriormente por otro grupo de investigación (Tsukamoto et al., 2014), sabemos que la tetraspanina CD9 modula negativamente la actividad catalítica de ADAM-17.

RESULTADOS

Por ello, comprobamos si la presencia o ausencia de CD9 modificaba la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2 (**Figura 14**). Analizamos, mediante experimentos de citometría de flujo, la expresión de ADAM-17 en parejas de líneas celulares en las que hemos neoexpresado CD9 (Colo320, HSB2, Raji y U937) o silenciado la expresión de CD9 (Jurkat). Como se puede ver en la **Figura 14**, no se observa que la presencia/ausencia de CD9 provoque ningún efecto en la reactividad de los AcMs detectada por citometría de flujo.

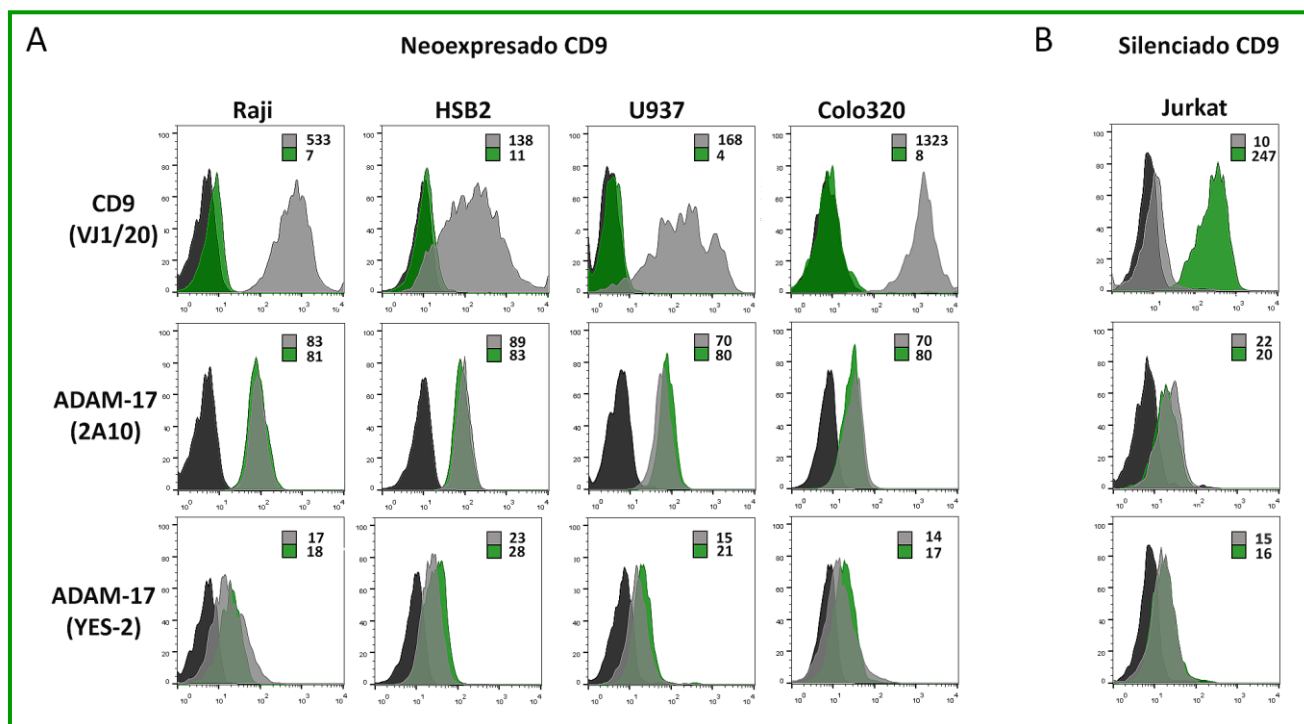


Figura 14. Estudio por citometría de flujo de la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2, en presencia/ausencia de la tetraspanina CD9 (detectada con el AcM VJ1/20). A) Pares de líneas celulares en las que hemos neoexpresado CD9 (Raji, HSB2, U937 y Colo320). B) Línea celular en la que hemos silenciado la expresión de CD9 (Jurkat). El histograma de color negro representa la expresión del control negativo, el histograma de color verde muestra la expresión CD9 (paneles superiores) o ADAM-17 (paneles medios e inferiores) en las líneas celulares control (sin transfectar CD9) y el histograma de color gris representa los niveles de expresión de CD9 o ADAM-17, en las líneas celulares en las que ha sido modificada la expresión de CD9. Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia.

Prosiguiendo con el estudio de la reactividad de los anticuerpos, en segundo lugar, quisimos comprobar el posible efecto de la estimulación de las células con el éster de forbol PMA (activador de PKC), que induce no solo un aumento de la capacidad de corte y liberación de ADAM-17 (Endres et al., 2003; Groth et al., 2016), sino que incrementa el procesamiento intracelular, la maduración de la enzima por Furina y el transporte a la superficie celular de ADAM-17 (Yanez-Mo et al., 2011). Cuando tratamos las líneas celulares THP-1, Colo320 y JY con

RESULTADOS

100 ng/ml de PMA durante 24 horas, observamos que no se modificaba significativamente la expresión de los epítomos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2 (**Figura 15**).

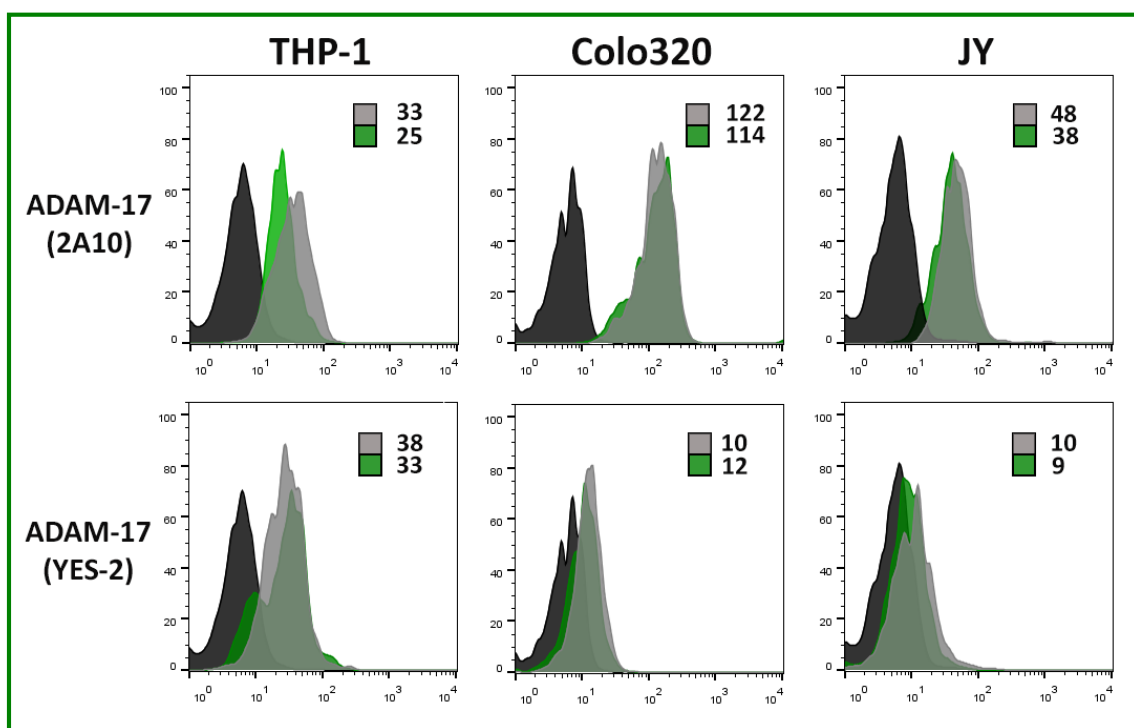


Figura 15. Estudio de la reactividad de los AcMs específicos frente a ADAM-17 (2A10 y YES-2) estimulando con PMA. Las líneas celulares THP-1, Colo320 y JY se trataron con 100 ng/ml de PMA durante 24 horas. El histograma de color negro representa la expresión del control negativo, el histograma de color verde muestra la expresión ADAM-17 (detectada con los AcMs 2A10 y YES-2) sin ningún estímulo y el histograma de color gris representa los niveles de expresión de ADAM-17 (detectada con los AcMs 2A10 y YES-2) al estimular con 100 ng/ml de PMA. Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia.

Hasta ahora, los datos obtenidos en el estudio de los epítomos reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2 a ADAM-17, sugieren que éstos anticuerpos son conformacionales y, por eso, en tercer lugar, decidimos comprobar si cambiando la conformación de la estructura terciaria de ADAM-17 se inducía/inhibía la expresión de estos epítomos. Para ello utilizamos agentes reductores para reducir los puentes disulfuro presentes en ADAM-17 (**Figura 16 panel A**). Seleccionamos la N-acetil-L-cisteína (NAC), que previamente habíamos usado en nuestro laboratorio para inducir cambios en la conformación de las integrina β_1 caracterizados por aumento de expresión del epítipo reconocido por el AcM HUST-21 (Gutierrez-Lopez et al., 2003), y el Ditiotreitolo (DTT), ya que está publicado que el DTT provoca un efecto inhibitor de la actividad de ADAM-17 (Wang et al., 2009). Cuando usamos dosis altas de NAC (25 mM), similares a las usadas por otros grupos en sus publicaciones (Delneste et al., 1997; Gruarin et al., 2001), observamos que aumentábamos la reactividad del AcM YES-2 y disminuía la reactividad del AcM

RESULTADOS

2A10, obteniendo prácticamente los mismos datos que los observados mediante citometría de flujo en condiciones de permeabilización celular (**Figura 16A** panel de la izquierda, histograma gris). Decidimos descartar que estuviéramos trabajando con dosis citotóxicas de NAC para las células y realizamos un test de viabilidad celular con azul tripán para cada dosis empleada. Comprobamos que cuando tratábamos a las células con dosis altas de NAC (25 mM), la viabilidad celular y la integridad de la membrana plasmática estaban comprometidas. Por este motivo, optamos por trabajar con dosis de NAC que no comprometieran la viabilidad celular (3mM) (**Figura 16A** panel de la izquierda, histogramas verdes), observando que la NAC no afecta a la expresión de los epítomos de unión de los AcMs YES-2 y 2A10. Lo mismo ocurre cuando utilizamos otro agente reductor como el DTT (**Figura 16A** panel de la derecha) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante (**Figura 16B**), no cambian la expresión de los epítomos de unión de los AcMs.

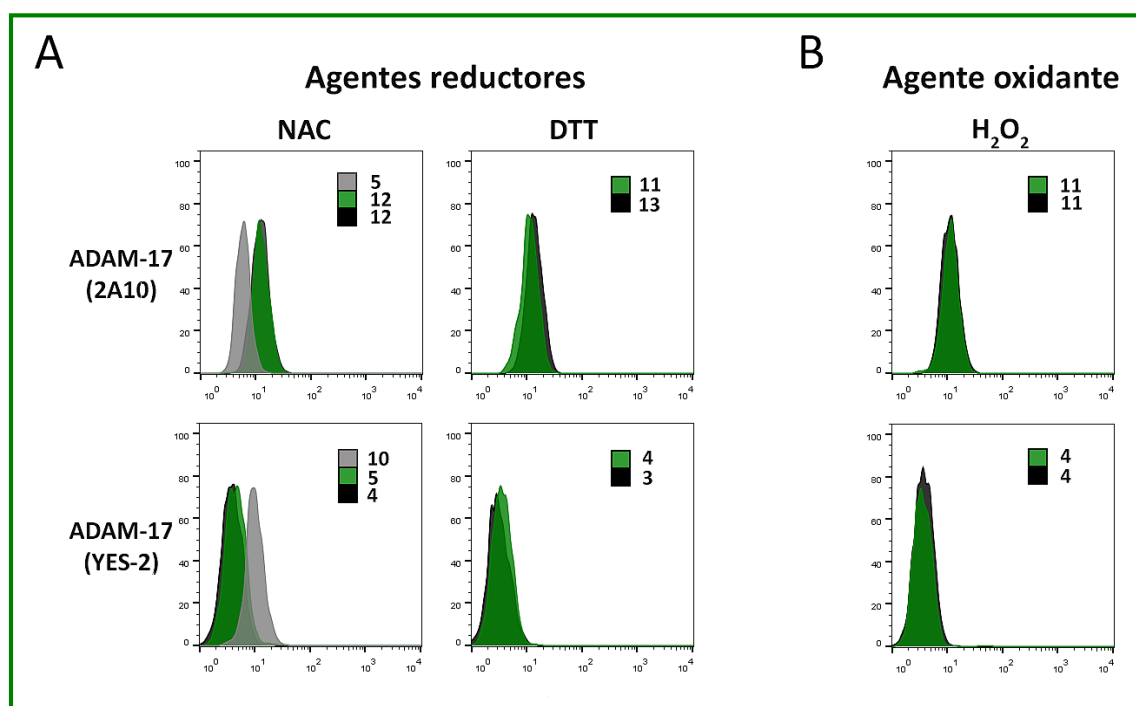


Figura 16. Estudio por citometría de flujo de la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2 en ausencia/presencia de agentes que cambian la conformación de ADAM-17 en la línea celular Raji. A) Agentes reductores (3 mM/25 mM de NAC y 7 mM DTT). B) Agente oxidante (500 μ M de H_2O_2). El histograma de color negro representa la expresión de ADAM-17 en ausencia de tratamiento, el histograma de color verde muestra la expresión ADAM-17 en presencia de los diferentes tratamientos y el histograma de color gris representa los niveles de expresión de ADAM-17 en presencia de NAC en una concentración citotóxica para las células (25 mM). Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia.

Finalmente, estudiamos el efecto de bloquear la polimerización de los filamentos de actina con la Citocalasina D (**Figura 17**) para modificar el tráfico intracelular dependiente de actina y con ello producir una alteración del tráfico de ADAM-17 hacia la membrana plasmática (Ebsen et al., 2013). En nuestros resultados, no detectamos ningún cambio en la reactividad de los AcMs estimulando con la Citocalasina D.

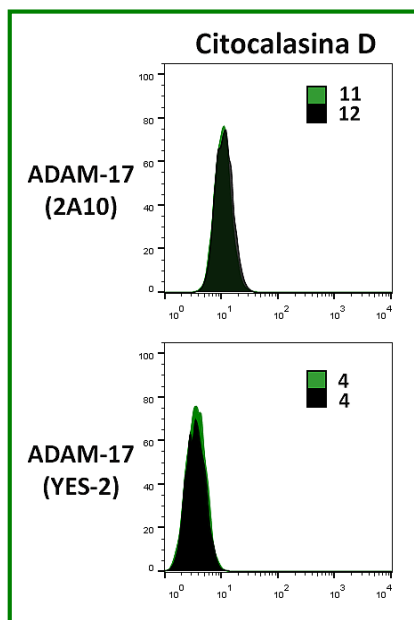


Figura 17. Estudio por citometría de flujo de la reactividad de los AcMs específicos frente a ADAM-17 (2A10 y YES-2), en la superficie de la línea celular Raji, en ausencia/presencia de 5 µg/ml Citocalasina D. El histograma de color negro representa la expresión de ADAM-17 en ausencia de Citocalasina D y el histograma de color verde muestra la expresión ADAM-17 en presencia de Citocalasina D. Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia.

Estudio de los efectos funcionales que ejercen los AcMs 2A10 y YES-2

Adhesión celular

Una vez obtenidos y caracterizados los AcMs 2A10 y YES-2 específicos frente al dominio desintegrina de ADAM-17 humano, quisimos comprobar si éstos AcMs ejercen algún efecto funcional sobre la adhesión celular. Para ello, realizamos ensayos de adhesión a la proteína recombinante ADAM-17-Fc con células estimuladas con el éster de forbol PMA, en presencia o ausencia de los dos AcMs y en condiciones de activación de las integrinas (en presencia de Mn²⁺). Realizamos las adhesiones con distintas líneas tumorales humanas (Colo-320, SKOV-3, HT1080 y LoVo) (**Figura 18**), observándose, en todas las líneas celulares, que la presencia de los AcMs 2A10 o YES-2 inhibe la adhesión celular a ADAM-17-Fc. Después de observar estos resultados en las líneas tumorales no leucocitarias, quisimos comprobar también lo que ocurría en la adhesión de distintas líneas celulares leucocitarias humanas a ADAM-17-Fc (**Figura 19**).

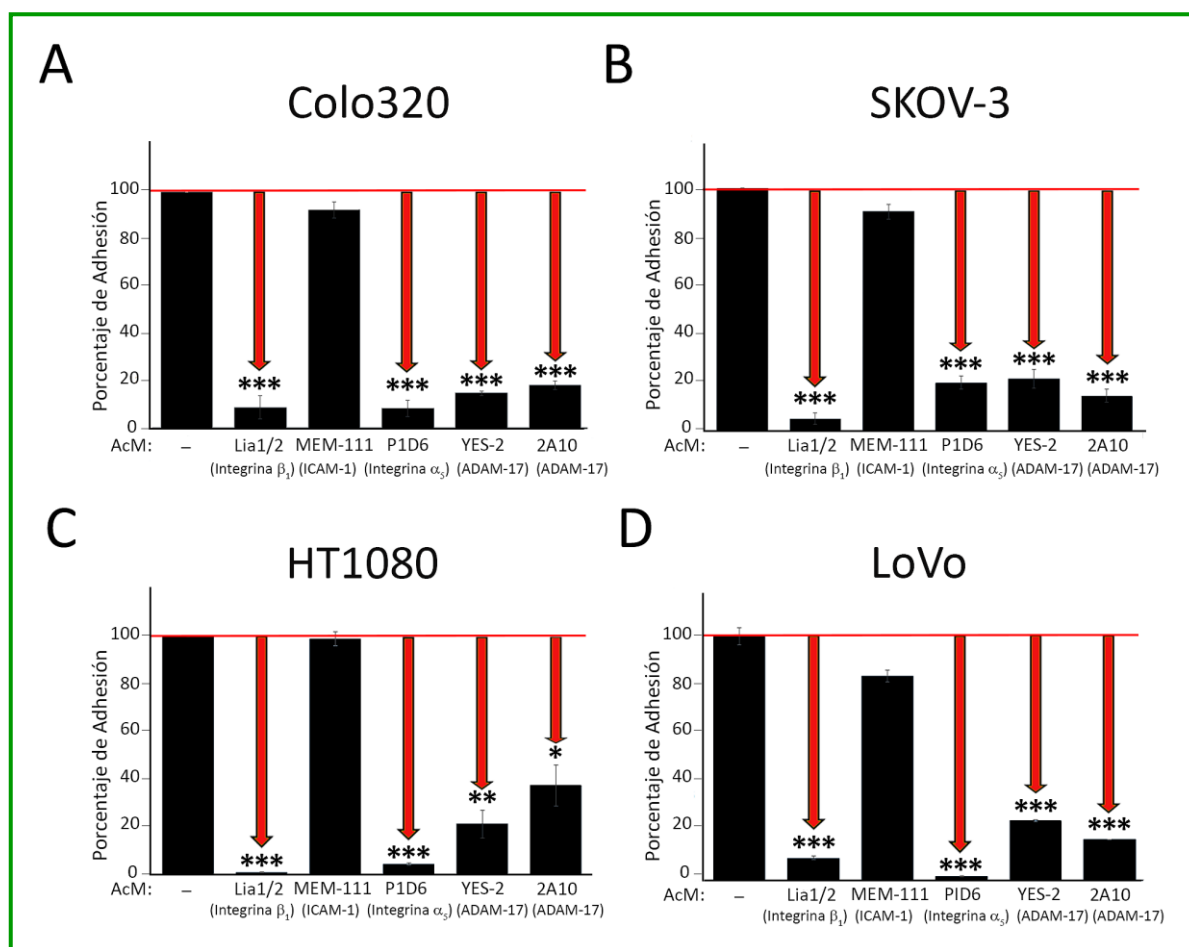


Figura 18. Adhesión celular de líneas tumorales humanas no leucocitarias a ADAM-17-Fc. Las gráficas representan los porcentajes de adhesión de las líneas celulares Colo320 (A), SKOV-3 (B), HT1080 (C) y LoVo (D). Las células estimuladas con 200 ng/ml de PMA durante 2 horas, se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM y se dejaron adherir a 37°C durante 60 minutos a placas de 96 pocillos recubiertos con 5 µg/ml de la proteína recombinante ADAM-17-Fc, en presencia de los anticuerpos indicados (a concentración final 10 µg/ml) y en condiciones de activación de las integrinas (en presencia de 200 µM de Mn^{2+}). Los datos representan el porcentaje medio de células que quedan adheridas después del lavado, considerando en todos los casos como 100 % la adhesión observada en células sin tratar con anticuerpos. Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos. independientes, cada uno realizado con triplicados. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$.

De forma similar a lo que ocurría con las células tumorales no leucocitarias, los dos AcMs provocan una potente inhibición de la adhesión en las líneas leucocitarias Jurkat y K562, mientras que las líneas celulares JY y Raji no mostraban adhesión a ADAM-17-Fc. Se ha descrito que la adhesión celular mediada por ADAM-17 es dependiente de la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Bax et al., 2004; Gooz et al., 2012; Trad et al., 2013). Los datos obtenidos en nuestras adhesiones celulares a ADAM-17-Fc corroboran esta interacción. Nos apoyamos en las siguientes evidencias: i) la adhesión de todas las líneas celulares a ADAM-17-Fc se inhibe de forma casi completa con un

RESULTADOS

anticuerpo bloqueante específico frente a la subunidad β_1 de las integrinas (AcM Lia 1/2) y también con un anticuerpo bloqueante específico frente a la subunidad α_5 de las integrinas (AcM P1D6); ii) las líneas celulares Colo320 y K562 tienen $\alpha_5\beta_1$ como único representante de la subfamilia β_1 de integrinas; iii) cuando empleamos una línea celular que no expresa integrinas β_1 por carecer de esta subunidad (células JY) o de la subunidad α_5 de las integrinas (células Raji), no detectamos adhesión celular a ADAM-17-Fc (Figura 20).

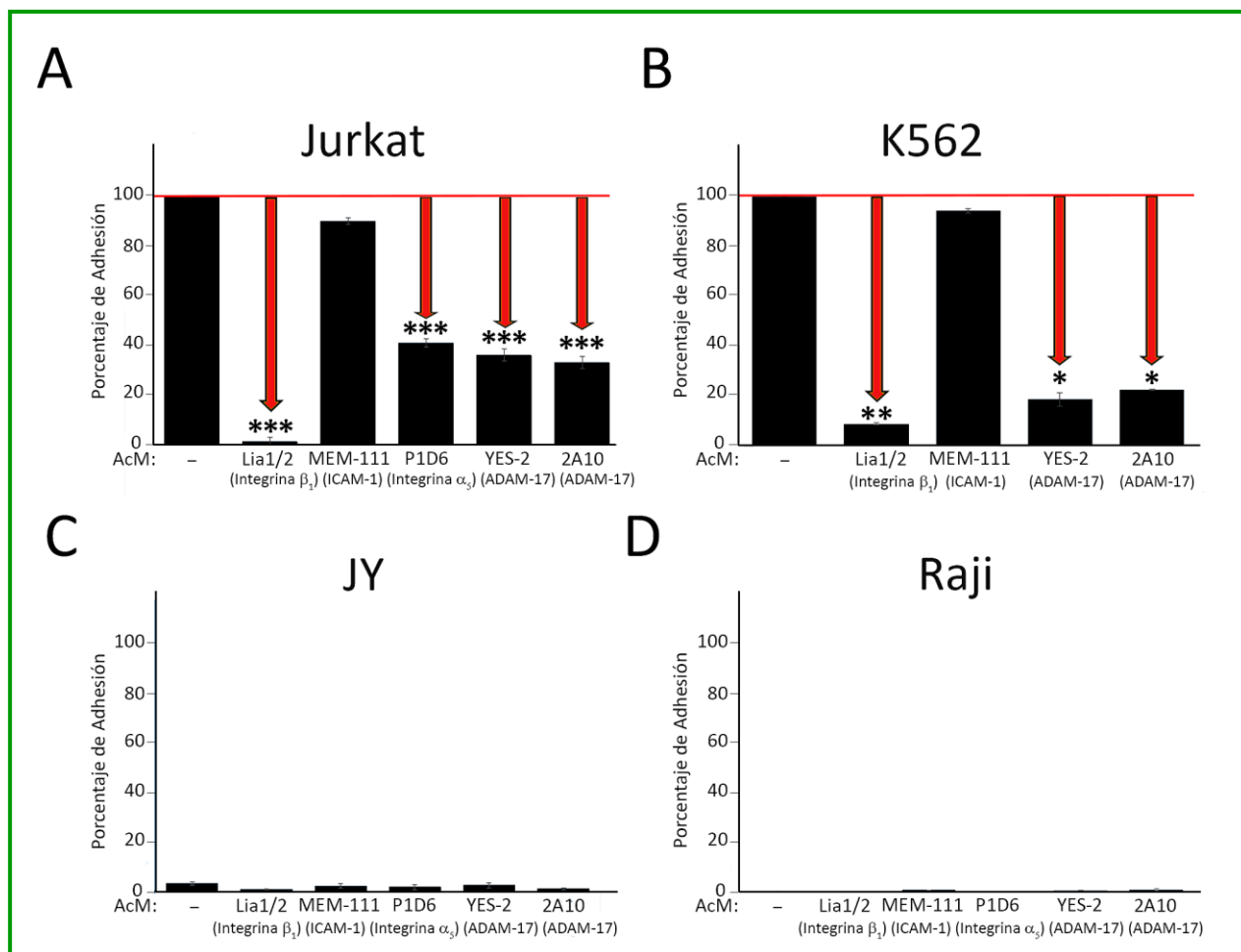


Figura 19. Adhesión celular de líneas leucocitarias humanas a ADAM-17-Fc. Las gráficas representan los porcentajes de adhesión de las líneas celulares Jurkat (A), K562 (B), JY (C) y Raji (D). Las células fueron estimuladas con 200 ng/ml de PMA durante 2 horas y se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM. Posteriormente, se dejaron adherir a 37°C durante 60 minutos a placas de 96 pocillos recubiertos con 5 µg/ml de ADAM-17-Fc, en presencia de los anticuerpos indicados (10 µg/ml) y en condiciones de activación de las integrinas (200 µM de Mn^{2+}). Como controles experimentales, se usaron anticuerpos que reconocen otra molécula (AcM MEM-111; ICAM-1). Los datos representan el porcentaje medio de células que quedan adheridas después del lavado, fijando el 100 % de adhesión en las células sin tratar con anticuerpos. Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

A

Subunidades integrinas	Líneas celulares			
	Colo320	K562	JY	Raji
β_1	+++	++	-	++
α_1	-	-	-	-
α_3	-	-	-	-
α_4	-	-	++	++
α_5	++	++	-	-
α_6	-	-	-	-

B

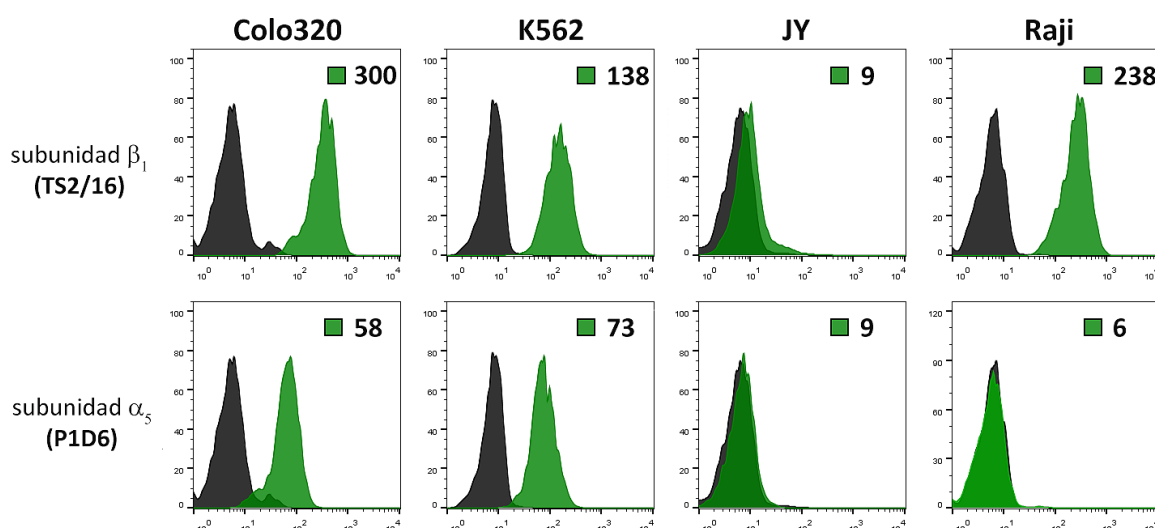


Figura 20. Análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de la subunidad β_1 y las subunidades α de las integrinas, en las líneas celulares humanas seleccionadas (Colo320, K562, JY y Raji). A) Cuadro resumen de los niveles de expresión de la subunidad β_1 y de las subunidades α de las integrinas en la superficie celular. B) Perfiles de citometría de flujo que reflejan los niveles de expresión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ en la superficie celular. Los histogramas de color negro representan los niveles de expresión del control negativo y los histogramas de color verde los de la subunidad β_1 (AcM TS2/16, paneles superiores) o de la subunidad α_5 (AcM P1D6, paneles inferiores). Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia. -: no hay expresión. +/-/++/+++ : escala subjetiva del nivel de expresión.

Por lo tanto, la presencia de los AcMs 2A10 y YES-2, inducen el bloqueo de la adhesión celular mediada a través de la interacción de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17. Este bloqueo, puede producirse mediante la acción de los anticuerpos al unirse o bien a la proteína recombinante ADAM-17-Fc inmovilizada sobre el soporte plástico (cambiando su conformación o bloqueando

RESULTADOS

en el dominio desintegrina el sitio de unión a la integrina) y/o adicionalmente alterando la interacción de la integrina con ADAM-17 que ocurre en la superficie celular (Bax et al., 2004).

Para caracterizar mejor el efecto observado de los AcMs 2A10 y YES-2 en la interacción entre $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17, realizamos los mismos experimentos sobre otro ligando de la integrina $\alpha_5\beta_1$, la fibronectina (Figura 21). Como ocurría en las adhesiones a ADAM-17-Fc, los AcMs 2A10 y YES-2 inhiben la adhesión de $\alpha_5\beta_1$ a la fibronectina. En este caso, los AcM producen una alteración de la asociación entre la integrina y ADAM-17 que ocurre en la superficie celular (interacciones de tipo *cis*) que afecta a la interacción de $\alpha_5\beta_1$ a su ligando fibronectina.

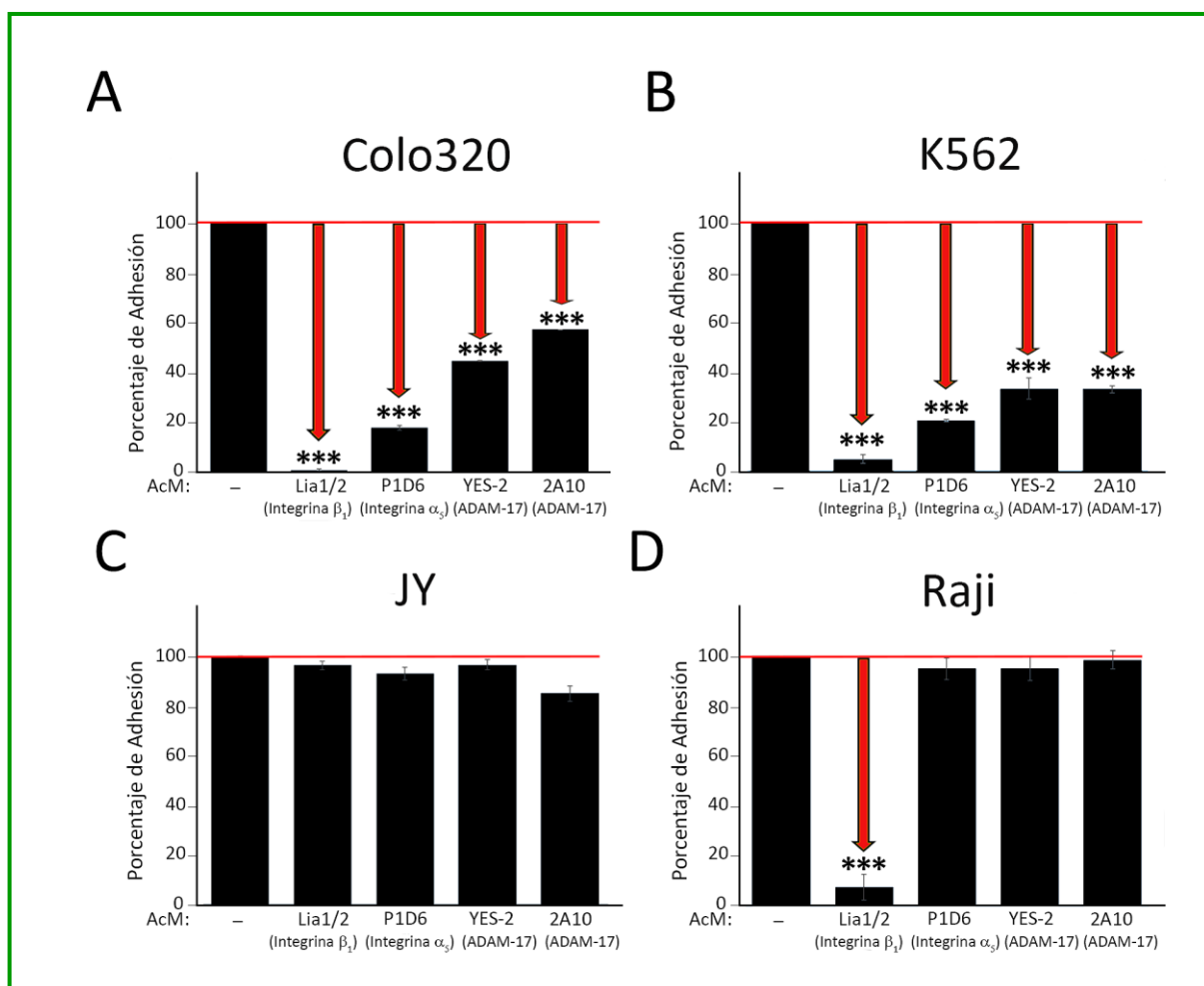


Figura 21. Adhesión de distintas líneas celulares humanas a fibronectina. Las gráficas representan los porcentajes de adhesión de las células Colo320 (A), K562 (B), JY (C) y Raji (D). Las células estimuladas con 100 ng/ml de PMA durante 1 hora, se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM y se dejaron adherir a 37°C durante 75 minutos a placas de 96 pocillos recubiertos con 5 µg/ml de fibronectina, en presencia de los anticuerpos indicados (10 µg/ml) y en condiciones de activación de las integrinas (50 µM de Mn^{2+}). Los datos representan el porcentaje de células que quedan adheridas después del lavado, fijando el 100 % en la adhesión de las células sin tratar con anticuerpos. Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. *** $p < 0.001$.

En este caso, podemos afirmar que los AcMs 2A10 y YES-2 inhiben la adhesión celular mediada específicamente a través la integrina $\alpha_5\beta_1$, debido a que cuando realizamos adhesiones de las células JY y Raji a fibronectina, se observa una importante adhesión celular porque la fibronectina es ligando de otras integrinas, como $\alpha_4\beta_7$ y $\alpha_4\beta_1$, que están presentes en las células JY y en las Raji (respectivamente) pero no observamos ningún efecto inhibitorio de los anticuerpos 2A10 y YES-2, al carecer estas líneas celulares de la integrina $\alpha_5\beta_1$ en su superficie.

Una vez comprobado el efecto inhibitorio de los AcMs en la adhesión celular mediada a través de la integrina $\alpha_5\beta_1$, decidimos profundizar en el estudio del efecto de estos AcMs en la adhesión a ADAM-17-Fc, ya que podrían llevar a cabo su efecto tanto a través de su unión a ADAM-17-Fc inmovilizado sobre el sustrato, como a través de su unión a ADAM-17 presente en la superficie celular. Con objeto de poder distinguir entre estas dos posibilidades, pre-incubamos los anticuerpos con ADAM-17-Fc inmovilizado en placas multipocillos antes de la adición de las células o pre-incubamos los anticuerpos con las células antes de ser estas añadidas a los pocillos y permitir su adhesión a ADAM-17-Fc. Seleccionamos dos de las líneas celulares utilizadas anteriormente para realizar estos experimentos, Colo320 y Jurkat (**Figura 22**). El primer experimento que realizamos fue la pre-incubación de los AcMs 2A10 y YES-2 con el sustrato ADAM-17-Fc, permitiendo la adhesión de las células después de lavar el exceso de AcMs. En este sentido de incubación, observamos que los AcMs inhiben la adhesión celular en ambos tipos celulares, por lo que podemos concluir que los AcMs 2A10 y YES-2, al unirse al dominio desintegrina de ADAM-17-Fc, estarían bloqueando su interacción con la integrina $\alpha_5\beta_1$ presente en la superficie de las células.

En segundo lugar, preincubamos los AcMs con las células y, después de lavarlas para eliminar el AcM no unido, permitimos su adhesión al sustrato ADAM-17-Fc. Los dos AcMs, 2A10 y YES-2, actúan del mismo modo que ocurría en el otro sentido de incubación, inhibiendo la adhesión celular a ADAM-17-Fc. Este resultado indica que los AcMs, al unirse al ADAM-17 de la superficie celular, están también provocando un efecto en *cis* sobre la integrina $\alpha_5\beta_1$, impidiendo que interaccione en *trans* con ADAM-17-Fc. Una posible hipótesis para explicar los efectos de los anticuerpos sobre la adhesión celular, es que la unión de los AcMs 2A10 y YES-2 a ADAM-17 de la superficie de las células, modifique el estado de activación de la integrina $\alpha_5\beta_1$ y, aun en presencia de estímulos activadores de las integrinas, la integrina $\alpha_5\beta_1$ no se pueda unir a su ligando ADAM-17-Fc. Otra explicación alternativa consistiría en que los AcMs activarían la integrina $\alpha_5\beta_1$ a través de su interacción en *cis* con ADAM-17, de forma que el sitio de unión al ligando de la integrina estaría ocupado uniéndose el dominio desintegrina de ADAM-17 celular, y

RESULTADOS

por tanto no estaría libre o disponible para unirse al sustrato ADAM-17-Fc inmovilizado en el soporte plástico. El resultado neto sería por tanto en este caso una inhibición de la adhesión celular, pero no mediada por una inactivación de la integrina sino por una activación y unión a un ligando en *cis*.

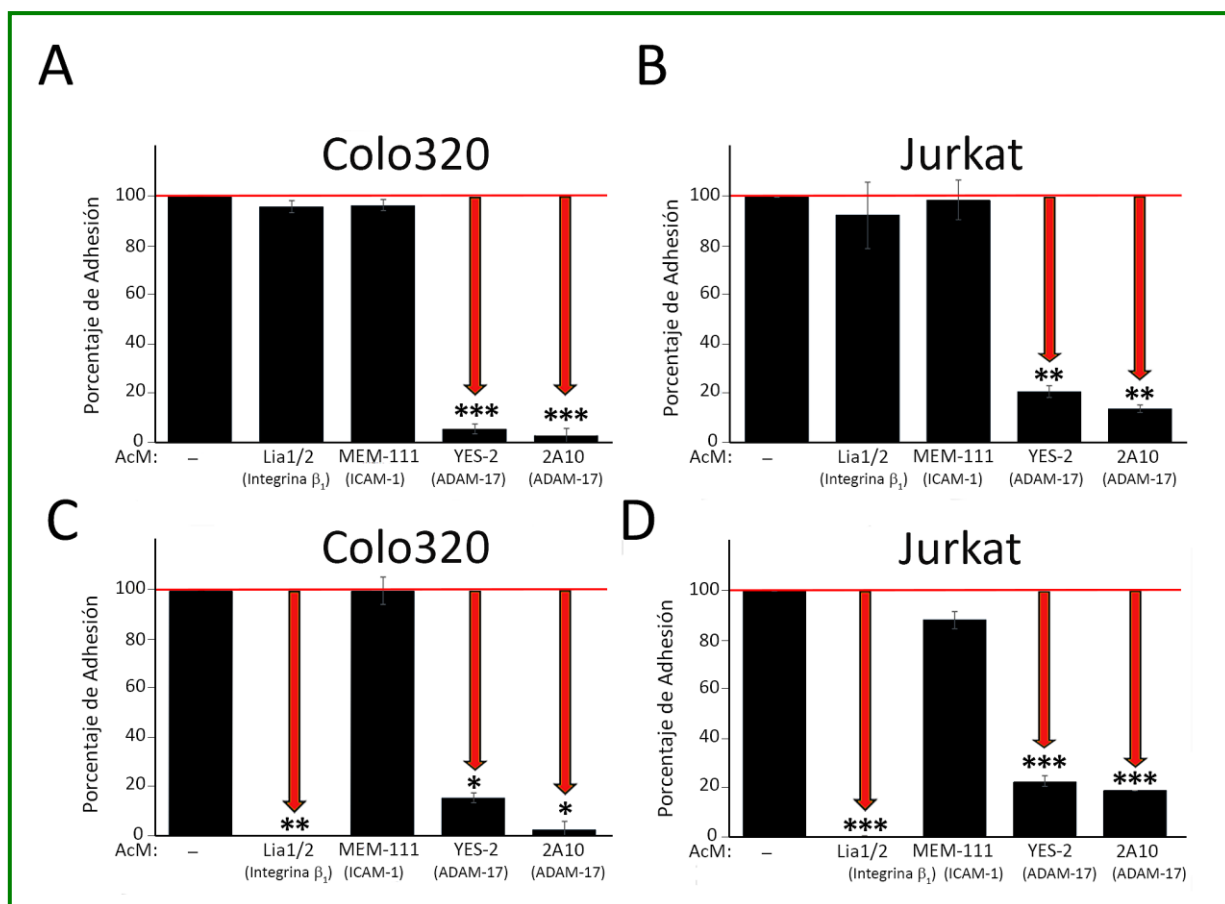


Figura 22. Efecto de los AcMs 2A10 y YES-2 sobre la adhesión celular a ADAM-17-Fc. Las gráficas representan los porcentajes de adhesión de las células Colo320 (A y C) y Jurkat (B y D). Las células estimuladas con 200 ng/ml de PMA durante 2 horas, se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM y se permitió su adhesión a 37°C durante 60 minutos a placas de 96 pocillos recubiertos con 5 µg/ml de ADAM-17-Fc en condiciones de activación de las integrinas (200 µM de Mn^{2+}). Como controles experimentales, se usaron anticuerpos que reconocen otras moléculas como ICAM-1 (AcM MEM-111) y la subunidad β_1 de las integrinas (AcM Lia 1/2). En el caso de las gráficas **A y B**, la incubación con los AcMs se realizó previamente con el sustrato ADAM-17-Fc, para posteriormente lavar el exceso de anticuerpo y permitir la adhesión a las células. En las gráficas **C y D**, la incubación con los AcMs se llevó a cabo exclusivamente con las células (Colo320 o Jurkat), después se lavaron las células para eliminar el exceso de AcM no unido y se añadieron a la placa con el sustrato ADAM-17-Fc inmovilizado para permitir su adhesión. Los datos representan el porcentaje medio de células que quedan adheridas después del lavado, fijando el 100 % de adhesión en las células sin tratar con anticuerpos. El experimento es representativo de 4 experimentos independientes. Las barras de error reflejan el \pm ESM de 4 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

Para discriminar entre estas dos hipótesis alternativas, decidimos estudiar por citometría de flujo si la presencia de los AcMs 2A10 y YES-2 modifican la activación de la integrina β_1 en las células Jurkat (**Figura 23**), reproduciendo las condiciones experimentales de activación celular utilizadas para las adhesiones celulares a ADAM-17-Fc. Con este objetivo, utilizamos el AcM HUST-21 que reconoce un epítipo conformacional presente en el dominio híbrido de la subunidad β_1 de las integrinas que se expresa específicamente cuando las integrinas de la subfamilia β_1 se encuentran activas (conformación de alta afinidad por los ligandos) (Luque et al., 1996; Mould et al., 2003). Observamos que la presencia de los AcMs 2A10 y YES-2 no modifica el estado de activación de la subunidad β_1 de las integrinas cuando las tratamos con 200 μM Mn^{2+} , es decir, cuando las integrinas están activas. Tampoco hemos observado alteraciones el estado de la integrina cuando se encuentra en conformación de baja afinidad (en presencia de 1 mM EDTA). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que los AcMs 2A10 y YES-2 no modifican la afinidad de la subunidad β_1 de las integrinas por sus ligandos.

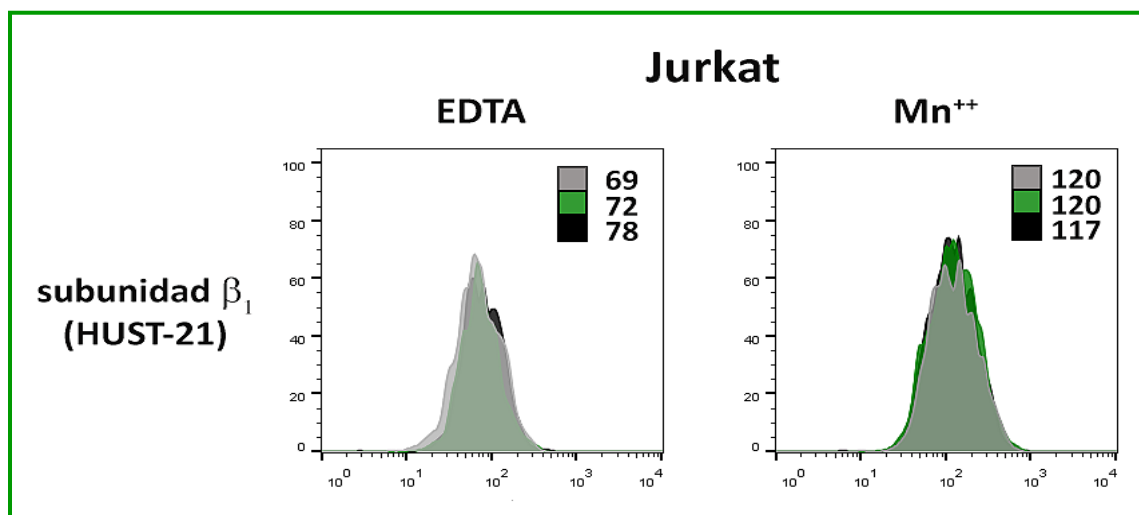


Figura 23. Estudio por citometría de flujo de la activación en la superficie celular de la subunidad β_1 de las integrinas, en la línea celular humana Jurkat. Las células se lavaron con tampón HEPES y se incubaron 1 hora a 37°C con 200 ng/ml de PMA, en presencia de los diferentes estímulos: 400 μM Mn^{2+} (panel de la derecha) o con 1 mM EDTA (panel de la izquierda). A continuación, se añadieron los distintos anticuerpos (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1 hora a 37°C. Después, las células se lavaron tres veces con tampón HEPES, se incubaron durante 20 minutos a 37°C con el anticuerpo HUST-21 biotinilado. Posteriormente, se lavaron las células y se incubaron con estreptavidina acoplada al fluorocromo Alexa Fluor-488. Los perfiles de citometría representan el nivel de expresión de la subunidad β_1 de las integrinas que se encuentran en la conformación de alta afinidad por sus ligandos. Los histogramas de color negro representan la reactividad del AcM HUST-21 cuando las células se han incubado previamente con el AcM PAINS-15 (específico frente a ALCAM, control negativo experimental); los histogramas de color verde cuando se han incubado con el AcM YES-2 y los histogramas de color gris cuando se han incubado las células con el AcM 2A10. Los números presentes en el interior del gráfico muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia.

RESULTADOS

Por otra parte, al disponer de diferentes pares de líneas celulares que expresan/no expresan CD9 (Colo320, Jurkat y HSB2) y sabiendo que la presencia de CD9 inhibe la actividad catalítica de ADAM-17 (Gutierrez-Lopez et al., 2011), decidimos comprobar si la presencia/ausencia de CD9 interviene en la adhesión celular mediada a través de la integrina $\alpha_5\beta_1$ al sustrato recubierto con ADAM-17-Fc (Figura 24). En todos los casos, la presencia de CD9 disminuye la adhesión a ADAM-17-Fc prácticamente al mismo nivel que ocurre cuando incubamos con los AcMs 2A10 y YES-2.

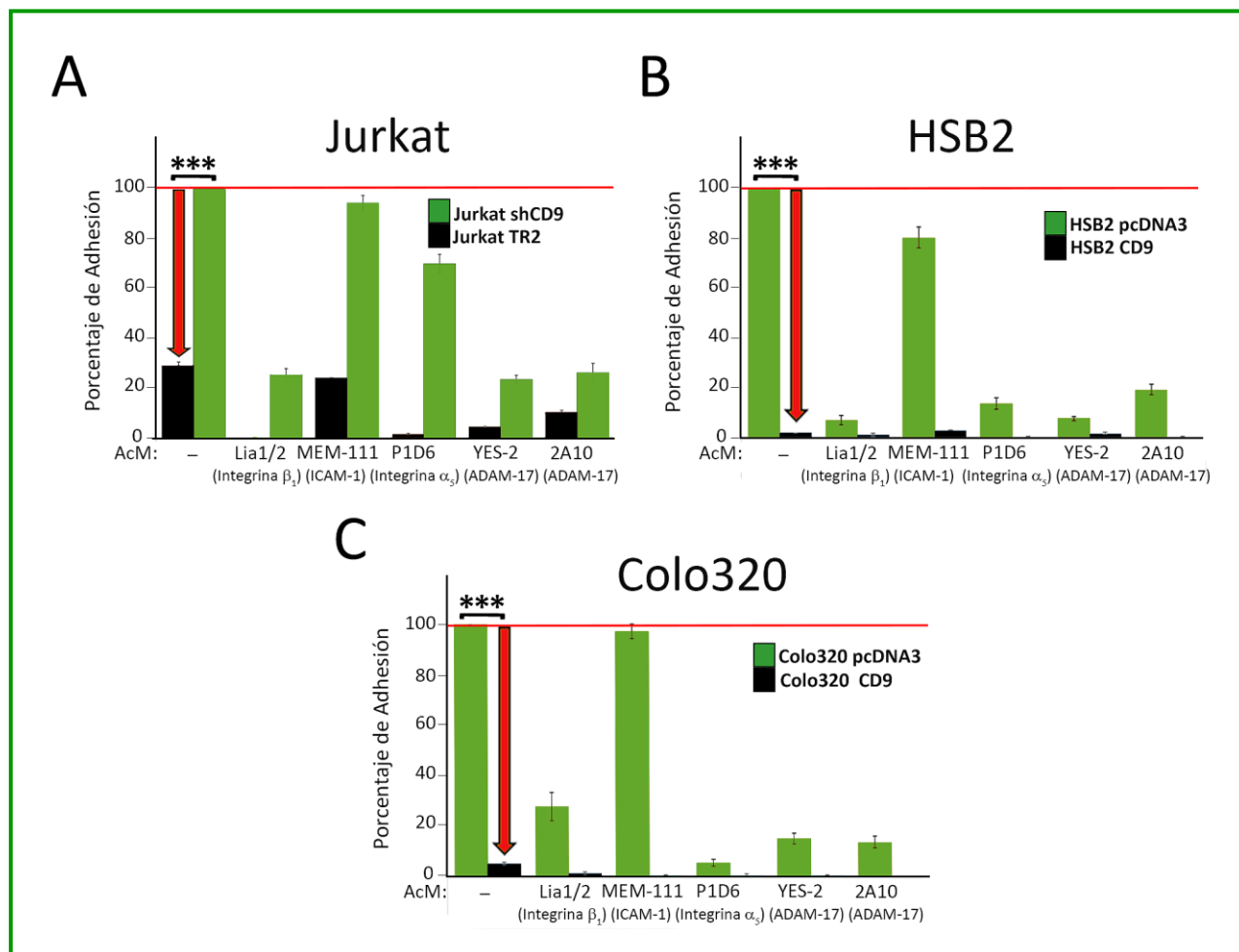


Figura 24. Adhesión celular a ADAM-17-Fc de pares de líneas celulares que expresan o no CD9. Las gráficas representan los porcentajes de adhesión de las células Jurkat (A), HSB2 (B) y Colo320 (C). Las células estimuladas con 200 ng/ml de PMA durante 2 horas, se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM y se dejaron adherir a 37 °C durante 60 minutos a placas de 96 pocillos recubiertos con 5 µg/ml de ADAM-17-Fc, en presencia de los anticuerpos indicados (10 µg/ml) y en condiciones de activación de las integrinas (200 µM de Mn^{2+}). Los datos representan el porcentaje medio de células que quedan adheridas después del lavado, fijando el 100 % en la adhesión de las células sin tratar con anticuerpos. Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. Las barras de color verde corresponden a las líneas celulares que no expresan CD9 (Jurkat shCD9, HSB2 pcDNA3 y Colo320 pcDNA3) y las barras de color negro a las líneas celulares que expresan CD9 (Jurkat TR2, HSB2 CD9 y Colo320 CD9). *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

Una vez estudiado el efecto inhibitorio de los AcMs en la adhesión celular a ADAM-17 mediada a través de la integrina $\alpha_5\beta_1$, decidimos realizar adhesiones celulares en un contexto celular con posible relevancia patológica. Para ello utilizamos un modelo de adhesión de células tumorales a monocapas de células endoteliales, que constituye una etapa fundamental del proceso de extravasación de las células tumorales durante la metástasis de numerosos tipos de cáncer. Como células tumorales utilizamos la línea celular de carcinoma colorrectal Colo320 (los tumores colorrectales metastatizan frecuentemente por vía hematógene) y de carcinoma ovárico SKOV-3 (los tumores de ovario metastatizan frecuentemente por vía peritoneal) y como modelo de células endoteliales usamos la línea celular EA-hy926, derivada a partir de un hibridoma de células HUVEC (**Figura 25**). Observamos de nuevo que, en los dos tipos celulares tumorales, la presencia de los AcMs 2A10 y YES-2 disminuye el porcentaje de adhesión a las EA-hy926. Por lo tanto, los AcMs 2A10 y YES-2 al unirse al ADAM-17 presente en ambos tipos celulares, son candidatos terapéuticos potenciales para modular la capacidad adhesiva de ADAM-17 y bloquear la adhesión, y posiblemente la extravasación, de las células tumorales a través del endotelio.

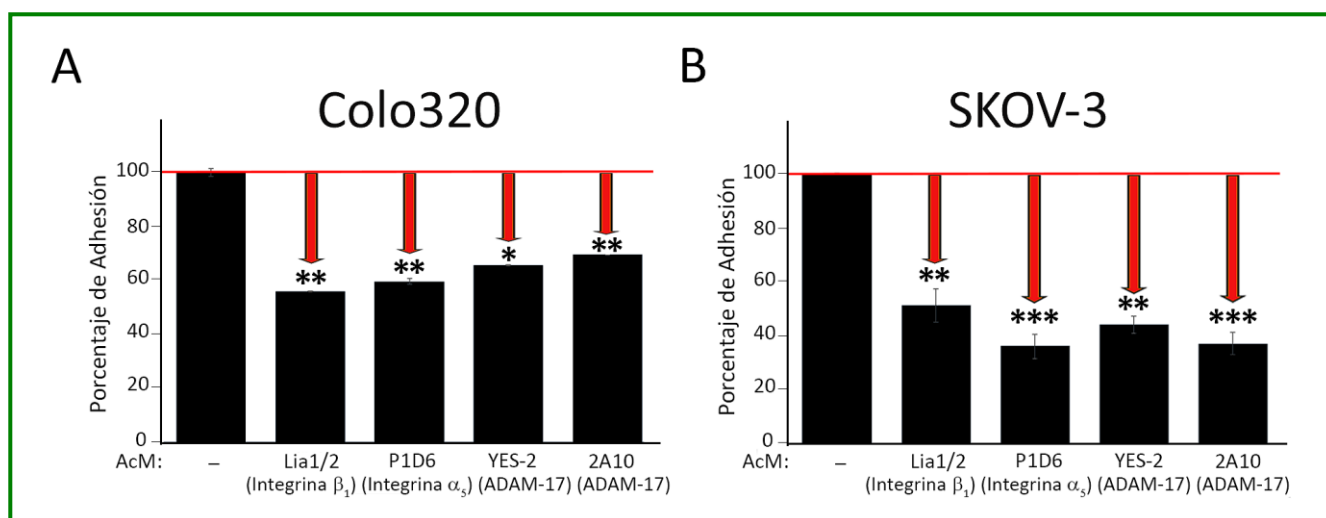


Figura 25. Adhesión celular de líneas tumorales humanas a las células endoteliales EA-hy926. Las gráficas representan los porcentajes de adhesión de las líneas celulares Colo320 (A) y SKOV-3 (B). Las células tumorales se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM y se dejaron adherir a 37°C durante 40 minutos (SKOV-3), o 60 minutos (Colo320), a placas de 96 pocillos recubiertos con 2×10^4 células EA-hy926 en presencia de los anticuerpos indicados (10 $\mu\text{g/ml}$). Los datos representan el porcentaje medio de células que quedan adheridas después del lavado, considerando el 100 % la adhesión de las células sin tratar con anticuerpos. Las barras de error reflejan el \pm ESM de 3 experimentos independientes, cada uno realizado con triplicados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Actividad de corte y liberación de ADAM-17 sobre ALCAM y TNF- α

Para determinar si los AcMs están regulando la actividad catalítica de ADAM-17, estudiamos el proceso de corte y liberación de dos de sus sustratos: el sustrato canónico TNF- α (Figura 26) y la molécula de adhesión ALCAM (Figura 27). Estos dos sustratos tienen topologías diferentes en la membrana plasmática celular (TNF- α : topología de tipo II; ALCAM: topología de tipo I) y se ha publicado que, en función de la topología del sustrato, su corte y liberación por ADAM-17 (*shedding*) puede ser regulado de distinta forma (Grotzinger et al., 2017).

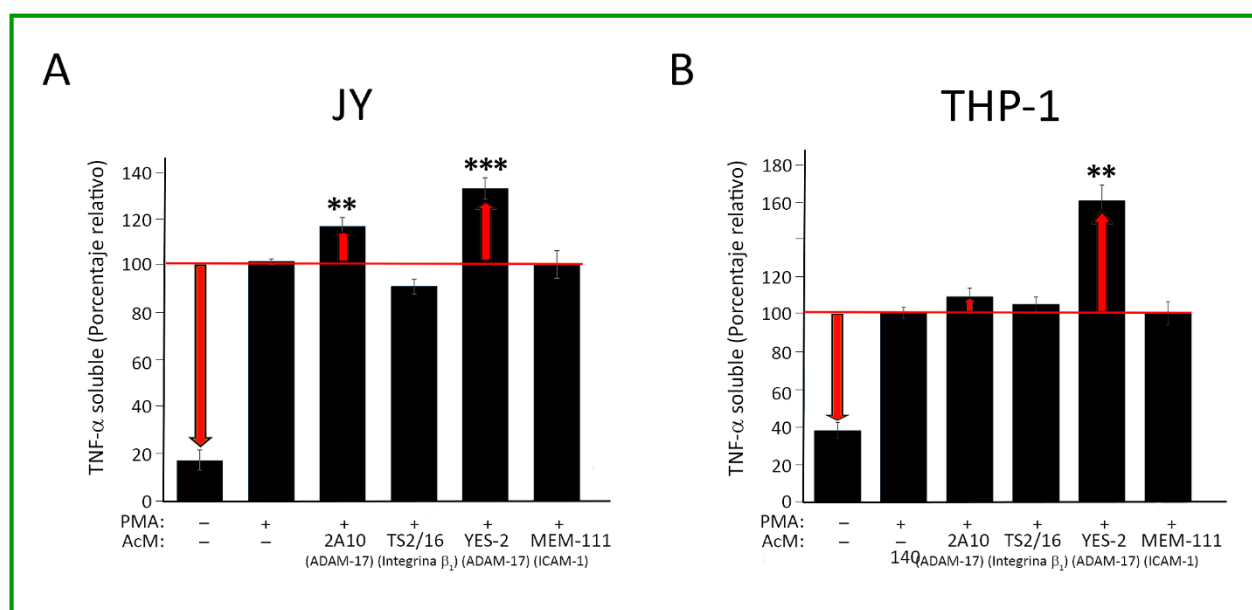


Figura 26. Efecto de los anticuerpos anti-ADAM-17 en la liberación de TNF- α en las líneas celulares JY y THP-1.
A) Cuantificación de la producción de TNF- α soluble por la línea celular JY. B) Cuantificación de la producción de TNF- α soluble por la línea celular THP-1. En ambos casos, las células se tratan con PMA 200 ng/ml durante 24 horas, en presencia o ausencia de los anticuerpos indicados (10 μ g/ml). La cantidad de TNF- α soluble liberado por las células se cuantificó mediante ELISA con una recta patrón de cantidades conocidas de la citoquina, fijando el 100 % en la de liberación obtenida de células tratadas sólo con PMA. Las barras representan el porcentaje de TNF- α soluble (medias \pm ESM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicados). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Con este objetivo, realizamos ensayos de ELISA de tipo sándwich para poder detectar la cantidad de sustrato soluble liberado en el medio de cultivo de las líneas celulares humanas JY y THP-1, estimuladas con PMA (induce un importante aumento en la activación de ADAM-17) y en presencia/ausencia de determinados anticuerpos. Considerando el 100 % la cantidad liberada por las células control tratadas únicamente con PMA, obtuvimos que los AcMs YES-2 y 2A10 aumentan el corte y liberación de TNF- α en el medio de cultivo. Sin embargo, es más evidente el efecto inducido por AcM YES-2 que por el AcM 2A10. En el caso de ALCAM, sólo hemos

conseguido detectar liberación de ALCAM soluble en la línea celular THP-1, donde observamos que el AcM 2A10 no tiene prácticamente ningún efecto, mientras que el AcM YES-2 aumenta su liberación al medio, como ocurría con la liberación de TNF- α .

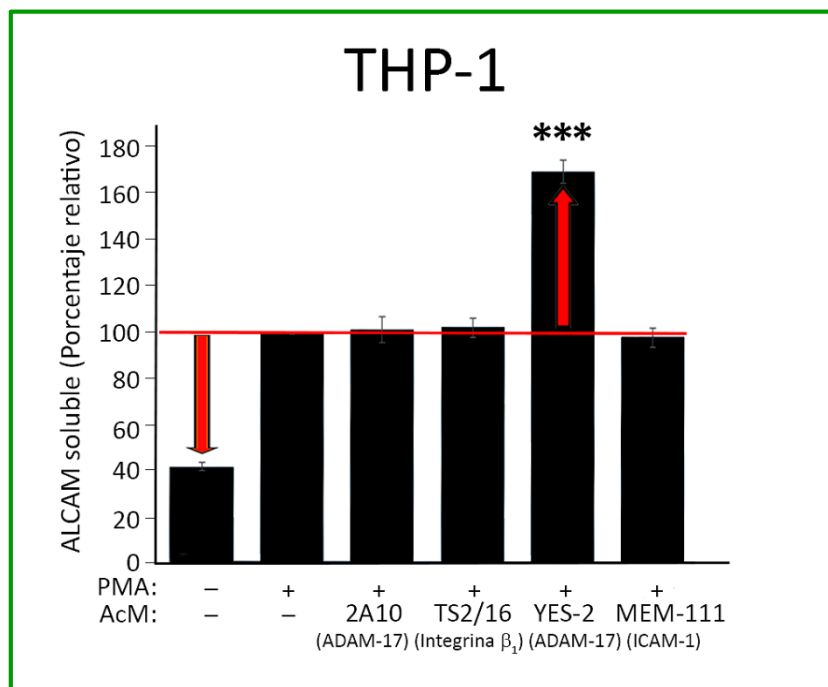


Figura 27. Efecto de los anticuerpos 2A10 y YES-2 en el procesamiento de ALCAM mediado por ADAM-17 en la línea celular THP-1. Cuantificación de la producción de ALCAM soluble en células tratadas, y sin tratar, con 200 ng/ml de PMA, en presencia o ausencia de los anticuerpos indicados (10 μ g/ml), durante 24 horas a 37°C. La cantidad de ALCAM soluble liberado por las células se cuantificó mediante ELISA con una recta patrón de cantidades conocidas ALCAM. Las barras representan el porcentaje de ALCAM soluble fijando el 100 % la liberación obtenida en las células tratadas sólo con PMA (medias \pm ESM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicados). *** $p < 0,001$.



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Shedding es un término inglés que hace referencia al proceso de corte y liberación de los ectodominios de las proteínas transmembrana. Este mecanismo es clave para que las células cambien rápidamente sus fenotipos de superficie y generen mediadores con el potencial para señalar influyendo, de este modo, en el comportamiento celular (Khokha et al., 2013; Yanez-Mo et al., 2011). Hasta el momento, sólo se ha observado procesamiento proteolítico de los ectodominios de proteínas transmembrana de tipo I y II o de proteínas ancladas a moléculas GPI, puesto que el sitio de escisión debe de localizarse cerca de la superficie celular. La familia de las ADAMs representa la principal familia de proteasas que intervienen en este procesamiento proteolítico, lo que les permite participar en una gran diversidad de procesos biológicos (Reiss and Saftig, 2009). Por todo ello, decidimos obtener una herramienta, como son los anticuerpos monoclonales, para profundizar en el estudio de las principales actividades de la proteasa ADAM-17 (adhesión celular y el procesamiento proteolítico de sus sustratos).

Como primer paso para conseguir este objetivo, obtuvimos hibridomas celulares inmunizando ratones con la proteína quimérica ADAM-17-Fc (contiene sólo los ectodominios de la enzima). Al fusionar las células inmortalizadas SP2 con los esplenocitos obtenidos de estos ratones, obtuvimos hibridomas que producen AcMs dirigidos contra todo el repertorio que constituye la respuesta inmune del animal de experimentación. Por este motivo, el primer paso fue seleccionar los hibridomas que secretaban anticuerpos específicos frente a ADAM-17, obteniendo dos AcMs que denominamos 2A10 y YES-2. Ambos AcMs son reactivos frente a ADAM-17-Fc inmovilizado sobre soporte plástico, pero no frente a otra proteína quimérica que también se encuentra fusionada al Fc (ICAM-1-Fc).

Caracterización de los anticuerpos monoclonales 2A10 y YES-2

En segundo lugar, nos propusimos caracterizar estos AcMs, para posteriormente estudiar el efecto de los AcMs 2A10 y YES-2 en las actividades de ADAM-17. En primer lugar, analizamos los epítomos de unión de los AcMs a ADAM-17 mediante ensayos de ELISA indirectos, inmovilizando diferentes dominios purificados de ADAM-17: desintegrina, próximo a la membrana y una construcción que abarca ambos dominios. Obtuvimos una reactividad positiva frente al dominio desintegrina, siendo totalmente negativa frente al dominio próximo a la membrana. Los datos obtenidos nos sugieren que los AcMs 2A10 y YES-2 reconocen el dominio desintegrina, sin

embargo, los epítomos reconocidos por estos AcM podrían ser conformacionales debido a que cuando están presentes en la misma construcción los dominios desintegrina y próximo a la membrana no hay reactividad de los AcMs. Este resultado implica que la presencia del dominio próximo a la membrana impide la exposición de los epítomos de unión de ambos AcMs, presentes en el dominio desintegrina, posiblemente mediante el ocultamiento de los mismos en la conformación de la construcción que abarca ambos dominios.

Al unirse los dos AcMs a epítomos conformacionales, estudiamos la posibilidad de que estuvieran reconociendo el mismo epítomo en el dominio desintegrina de ADAM-17. Para confirmar/descartar esta sospecha, decidimos llevar a cabo experimentos de competición entre los AcM 2A10 y YES-2. Observamos que los AcMs intercompiten pero a distinto nivel, es decir, el nivel máximo de intercompetición (mismo nivel que si compitiera consigo mismo el AcM) se establece cuando incubamos primero el ADAM-17-Fc con el AcM 2A10. Sin embargo, cuando incubamos primero con el AcM YES-2 se produce una intercompetición con el AcM 2A10, pero de menor grado. Podemos interpretar estos resultados de dos maneras diferentes: 1) si compitiesen por el mismo epítomo (o epítomos solapantes), podría ocurrir que el AcM 2A10 tuviese una mayor afinidad de unión a ADAM-17 y, por lo tanto, desplazase la unión previa del AcM YES-2 al epítomo (observando experimentalmente una intercompetición parcial); 2) los dos epítomos podrían ser no solapantes y distantes, de tal manera que la unión previa del AcM 2A10 a su epítomo podría cambiar la conformación de ADAM-17, ocultando el epítomo reconocido por el AcM YES-2.

Teniendo en cuenta estas dos posibilidades, optamos por analizar la reactividad de ambos anticuerpos en distintas líneas celulares y comprobar si se comportan de igual o diferente manera. Estudiamos la reactividad por citometría de flujo en una gran variedad de líneas celulares humanas como: linfocitos T (Jurkat, HSB2), linfocitos B (JY, Raji), eritroblastoides (K562), monocitos (THP-1, U937), colocalcarinoma de colon (Colo320), adenocarcinoma de ovario (SKOV-3) y fibrosarcoma (HT1080). En la gran mayoría de líneas celulares, la reactividad del AcM 2A10 es mayor que la reactividad del AcM YES-2, lo que podría indicar que el AcM 2A10 posee una mayor afinidad por ADAM-17. No obstante, en la línea celular LoVo, la reactividad del AcM YES-2 es mayor que la reactividad de 2A10. Este resultado, nos llevó a pensar en un primer momento que la deficiencia de la proconvertasa Furina en la línea celular LoVo podría suponer un aumento de la expresión en la superficie celular de la forma inmadura de ADAM-17 (que normalmente está poco expresada en la membrana plasmática) y, por lo tanto, el AcM YES-2 sería más reactivo en esta línea celular porque la expresión de su epítomo en ADAM-17 dependiese de una conformación dictada por la presencia del prodominio. Siguiendo el mismo

razonamiento, la disminución de la reactividad en superficie del AcM 2A10 podría indicar que reconoce específicamente la forma madura, sin predominio, de ADAM-17. No obstante, otros autores han demostrado que pese a no tener Furina, la línea celular LoVo posee otras proconvertasas (PACE4 y PC7) que compensan la falta de actividad de la Furina, por lo que no estarían significativamente modificados los niveles de la forma inmadura de ADAM-17 en la superficie celular (Srouf et al., 2003). Por este motivo, decidimos comprobar desde otro punto de vista si la presencia del predominio interviene en la unión del AcM YES-2 a su epítipo en ADAM-17. Realizamos experimentos de citometría de flujo en condiciones de permeabilización para acceder a la forma inmadura de ADAM-17, que mayoritariamente es intracelular (Lorenzen et al., 2016). Observamos que el AcM YES-2 aumenta su reactividad cuando se permeabilizan las células y, sin embargo, disminuye la reactividad del AcM 2A10. Los resultados observados para el AcM YES-2 pueden interpretarse de dos formas: 1) la expresión de su epítipo en el dominio desintegrina de ADAM-17 depende de la presencia del predominio, ya que aumenta cuando permitimos el acceso al reservorio intracelular que almacena la forma madura e inmadura; 2) el AcM YES-2 posee una baja afinidad por ADAM-17 y, al aumentar la cantidad de moléculas de ADAM-17 disponibles, resulta más eficiente su unión. En el caso del AcM 2A10, la disminución de su reactividad al permeabilizar puede deberse a que, al alterar la membrana plasmática, aumenta la dispersión de la forma madura y se dificulte así su unión a ADAM-17. Para comprender qué estaba ocurriendo realmente, quisimos confirmar en experimentos de inmunoprecipitación si los AcMs arrastraban específicamente alguna forma concreta de ADAM-17. Observamos que el AcM YES-2 se une a la forma madura y el AcM 2A10 se une tanto a la forma madura como inmadura. En el caso del AcM YES-2 es posible que no se vea su unión a la forma inmadura debido a la baja eficiencia que se obtiene con este anticuerpo en la técnica de inmunoprecipitación, como se puede observar al comparar la banda de ADAM-17 madura obtenida con los AcMs 2A10 y YES-2. De acuerdo con todos estos resultados, podemos descartar que el AcM YES-2 reconozca específicamente la forma inmadura de ADAM-17 y, por otro lado, que el AcM 2A10 se una solamente a la forma madura.

Continuando con la caracterización, decidimos analizar si la presencia/ausencia de la tetraspanina CD9, modificaba la reactividad de los AcMs, ya que hemos descrito previamente en nuestro laboratorio cómo la interacción directa de CD9 con ADAM-17, modula negativamente la actividad *sheddas* de ADAM-17 frente a dos de sus sustratos: TNF- α e ICAM-1 (Gutierrez-Lopez et al., 2011). Comprobamos que CD9 no ejerce ningún papel en la reactividad de los AcMs cuando éstos se unen al ADAM-17 presente en la superficie celular. Por lo tanto, si la modulación funcional llevada a cabo por CD9 estuviera cambiando la conformación de esta

metaloproteasa, no sería un estímulo suficiente para alterar la exposición/expresión de los epítomos en el dominio desintegrina reconocidos por los AcMs 2A10 y YES-2. Prosiguiendo con esta línea de trabajo, buscamos posibles estímulos o tratamientos, que pudieran alterar la reactividad de nuestros anticuerpos. En primer lugar, decidimos trabajar con el éster de forbol PMA, no observándose cambios en la reactividad de nuestros AcMs con este tratamiento. El PMA es uno de los más potentes y efectivos inductores de la actividad de ADAM-17, desencadenando el *shedding* de varios de sus sustratos, como por ejemplo el TNF- α (Groth et al., 2016), además de inducir un rápido aumento de ADAM-17 maduro en la superficie celular de líneas celulares como HEK293 o HeLa, seguido de internalización y degradación lisosomal de la proteasa (Lorenzen et al., 2016). Hay que destacar que los efectos que se desencadenan al estimular las células con PMA dependen del tiempo de exposición, puesto que, al estimular durante 24 horas, la pérdida de la forma madura es compensada con la inducción de la biosíntesis. Por otro lado, al estimular con PMA se observa un aumento de la forma inmadura que sólo es efectivo a tiempos cortos, puesto que, al no tener suficiente tiempo para procesarse, se acumula en el interior celular (Groth et al., 2016). Por ello, a los tiempos de estimulación que se han utilizado en esta tesis, el mayor efecto que ejerce el PMA se produce sobre la actividad *sheddas*, que no afecta a la reactividad de los AcMs 2A10 y YES-2. Lo mismo sucede a tiempos cortos de estimulación con PMA, aunque se produce un aumento de la forma inmadura en la superficie, no observamos cambios en la reactividad de los anticuerpos (datos no mostrados). También seleccionamos reactivos para conseguir cambiar la conformación terciaria de ADAM-17 y determinar si, de esta forma, éramos capaces de alterar la reactividad de los anticuerpos. Utilizamos agentes reductores (NAC y DTT) y un agente oxidante (peróxido de hidrógeno). Además, tratamos las células con un inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina (Citocalasina D) para observar si los cambios del tráfico celular de ADAM-17 afectaban a la reactividad de los AcMs. Con ninguno de estos tratamientos conseguimos modificar de forma significativa la expresión de los epítomos de unión de los AcMs a ADAM-17. Es decir, que pese a reducir los puentes disulfuro de la estructura terciaria de la enzima, no se observó un aumento/disminución de la reactividad de los AcMs. Lo mismo sucede con el bloqueo de la polimerización del citoesqueleto de actina, pese a alterar el tráfico intracelular y disminuir la movilización de ADAM-17 hacia la superficie celular (Ebsen et al., 2013), no observamos una disminución de la reactividad de los AcMs medida por citometría de flujo.

En resumen, los datos obtenidos sugieren que ambos AcMs se podrían unir a epítomos conformacionales localizados en el dominio desintegrina de ADAM-17, sin embargo, la reactividad de los anticuerpos, es decir la exposición/expresión de estos epítomos, no se

modifica con la reducción de los puentes disulfuro de la estructura terciaria de ADAM-17, ni al cambiar el tráfico intracelular de la proteasa, ni con la presencia/ausencia de un estímulo (PMA) o de CD9.

Estudio de los efectos funcionales que ejercen los AcMs 2A10 y YES-2

ADAM-17 se expresa de manera constitutiva en una gran variedad de tejidos (Black et al., 1997). Además, posee un gran repertorio de sustratos susceptibles de ser procesados, lo cual permite que ADAM-17 participe en múltiples procesos celulares (Matthews et al., 2016). Por este motivo, es importante analizar los efectos potenciales que pueden ejercer nuestros anticuerpos en las principales actividades de ADAM-17: adhesión celular y proteólisis.

En primer lugar, nuestros resultados en **las adhesiones celulares** a ADAM-17-Fc corroboran la interacción específica entre la integrina $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17, que previamente habían descrito otros grupos de investigación (Bax et al., 2004; Gooz et al., 2012; Trad et al., 2013), los cuales determinaron que la interacción se establece específicamente a través del dominio desintegrina de ADAM-17 (Bax et al., 2004). En segundo lugar, nuestros datos indican que la presencia de los AcMs 2A10 y YES-2 durante las adhesiones celulares a ADAM-17-Fc inhiben la adhesión dependiente de $\alpha_5\beta_1$ a ADAM-17-Fc. Como hemos demostrado en el apartado de caracterización, los AcMs 2A10 y YES-2 se unen al dominio desintegrina de ADAM-17. Probablemente, al unirse a sus epítomos en este dominio bloquean el sitio de interacción entre $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17 y, por ello, al tratar con nuestros AcMs se inhibe la adhesión. Además, hemos estudiado el efecto de los AcMs en ensayos de adhesión a fibronectina, que es el ligando principal de la integrina $\alpha_5\beta_1$. Del mismo modo que ocurre en las adhesiones a ADAM-17-Fc, observamos que los AcMs 2A10 y YES-2 disminuyen la adhesión celular a fibronectina. En nuestros experimentos de adhesión, hemos utilizado líneas celulares que presentan diferente patrón de expresión de integrinas de la subfamilia β_1 : líneas que poseen exclusivamente la integrina $\alpha_5\beta_1$ (K562 y Colo320), que carecen de la subunidad β_1 de las integrinas (JY) o que sólo carecen de la subunidad α_5 de las integrinas (Raji). Cuando una línea celular no posee alguna de las dos subunidades de la integrina $\alpha_5\beta_1$ no se produce adhesión a ADAM-17-Fc, pero sí que existe adhesión a fibronectina, ya que, estas líneas celulares poseen otras integrinas que tienen como ligando a la fibronectina ($\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$). Cuando analizamos el efecto de los AcMs, observamos que éstos únicamente tienen un efecto bloqueante sobre la adhesión celular si la línea celular que se va adherir a ADAM-17-Fc o a fibronectina posee la integrina $\alpha_5\beta_1$. Sin embargo, si no está presente esta integrina los AcMs 2A10 y YES-2 no interfieren en la adhesión celular.

Una vez establecido que los AcMs inhiben la adhesión a ADAM-17-Fc, analizamos el efecto de la unión de cada anticuerpo o bien a ADAM-17 inmovilizado sobre el sustrato o bien a ADAM-17 de la superficie de las células, de forma independiente. Para analizar estos resultados, hay que tener en cuenta los trabajos de otros grupos de investigación que proponen que el complejo formado al interaccionar la integrina $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17 en la superficie celular mantiene a las moléculas en estado inactivo y sólo se liberan del complejo al activar a la integrina con Mn^{2+} (Bax et al., 2004) o a ADAM-17 con GPCR (*G Protein-Coupled Receptor*) (Gooz et al., 2012). En nuestro caso, conociendo a qué dominio se unen los anticuerpos y el efecto inhibitor que tienen estos anticuerpos en la interacción de $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17, era de esperar que la incubación de los anticuerpos con ADAM-17-Fc sobre el sustrato disminuyese la adhesión. Del mismo modo, cuando incubamos los anticuerpos solamente con las células también observamos una disminución de la capacidad de adhesión. Es decir, los anticuerpos al unirse a ADAM-17 presente en las células, están dificultando de algún modo que la integrina se una a ADAM-17-Fc en *trans*. Esto ocurre pese a que nuestros experimentos se realizan en condiciones de activación (con Mn^{2+}) que, como hemos comentado, favorecen la disociación de ADAM-17 y $\alpha_5\beta_1$ y, por lo tanto, la integrina estaría libre para poder interaccionar con su ligando sobre el sustrato (ADAM-17-Fc). Nuestros AcMs presentan un doble efecto en la interacción de la integrina $\alpha_5\beta_1$ a ADAM-17-Fc: por un lado, bloquean la interacción de la integrina $\alpha_5\beta_1$ a ADAM-17 en *trans*, ya que los anticuerpos se unen al dominio desintegrina e impiden que la integrina interaccione con ADAM-17 por ese mismo dominio; y, por otro lado, deben promover cambios en la integrina $\alpha_5\beta_1$ en la superficie de las células en *cis*, impidiendo de algún modo la unión de la integrina a su ligando ADAM-17-Fc en *trans*. Los efectos de los anticuerpos cuando los incubamos solamente con las células pueden deberse a que estos regulen a través de ADAM-17 celular la afinidad o la avidez de la integrina $\alpha_5\beta_1$ y, por tanto, la adhesión celular. Para determinar si los anticuerpos regulan la afinidad de esta integrina, analizamos el posible efecto de nuestros AcMs sobre la expresión del epítipo HUTS-21, indicador de la conformación de alta afinidad de esta subfamilia de integrinas y observamos que los AcMs no modifican su estado de activación. El siguiente paso en esta investigación sería estudiar si los anticuerpos son capaces de regular el estado de agregación (avidez) de la integrina. Con este objetivo, habría que llevar a cabo estudios, utilizando técnicas de microscopia confocal y TIRFM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscope*), para conseguir cuantificar el número y tamaño de los agrupamientos de la integrina $\alpha_5\beta_1$ en la superficie de adhesión celular a ADAM-17-Fc en células previamente incubadas o no con los AcMs 2A10 y YES-2.

Además de conocer el efecto de los AcMs 2A10 y YES-2, quisimos comprobar si la presencia/ausencia de CD9, interviene en la interacción entre $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17-Fc. Para ello realizamos adhesiones a ADAM-17-Fc con pares de líneas celulares que expresan o no CD9. Observamos que la presencia de CD9, en todas las líneas celulares empleadas (Jurkat, HSB2 y Colo320), disminuía drásticamente la adhesión a ADAM-17-Fc. Así que, la modulación negativa que ejerce CD9 sobre ADAM-17, no solo afecta a la actividad catalítica de la enzima (Gutierrez-Lopez et al., 2011), sino que también influye en la interacción celular de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17. Pese a no observar diferencias en la reactividad de los anticuerpos en la superficie celular en presencia/ausencia de CD9, es decir, no se producen cambios en los niveles de expresión de ADAM-17 en la superficie celular, CD9 puede estar interfiriendo a otros niveles. Como la presencia de CD9 disminuye la adhesión a ADAM-17-Fc nos planteamos varias opciones para explicar este efecto. Por un lado, la presencia de CD9 podría producir cambios en la afinidad de la integrina, de manera que se aumente la interacción en *cis* de $\alpha_5\beta_1$ con el dominio desintegrina de ADAM-17 celular y, como consecuencia, disminuya la interacción de la integrina en *trans* con ADAM-17-Fc sobre el sustrato. Por otro lado, CD9 también puede producir cambios en la avidéz de la integrina a través de su “secuestro” en determinados TEMs (*Tetraspanin-Enriched Microdomain*) organizados por CD9. Estos microdominios están compuestos, entre otras moléculas, por integrinas (Yanez-Mo et al., 2009), de forma que, CD9 podría estar favoreciendo la interacción de $\alpha_5\beta_1$ con ADAM-17 en los microdominios e impidiendo que $\alpha_5\beta_1$ interaccione con ADAM-17-Fc. Otra posible interpretación es que los cambios de la expresión de CD9 en las parejas de líneas celulares podrían afectar a los niveles de expresión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ en superficie. Hemos comprobado por citometría de flujo que, pese a no observar la misma expresión de cada subunidad de la integrina $\alpha_5\beta_1$ en presencia o ausencia de CD9, no hay una tendencia clara y uniforme (datos no mostrados). En algún caso, la presencia de CD9 no está asociada con una disminución de los niveles de $\alpha_5\beta_1$ en la superficie celular, sino más bien con un aumento de los mismos, por lo que descartamos esta opción como responsable de la disminución de la adhesión celular a ADAM-17-Fc. Se conoce que la presencia de CD9 regula la adhesión celular mediada por la integrina $\alpha_5\beta_1$ a través de la molécula DPP IV (*DiPeptidyl Peptidase IV*), reduciendo los niveles de DPP IV y, con ello, disminuyendo la activación de la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Okamoto et al., 2014), lo que podría explicar la disminución observada de la adhesión celular mediada a través de esta integrina a ADAM-17-Fc.

Continuando con el análisis de la capacidad adhesiva de ADAM-17, decidimos trabajar en un modelo con posible implicación en patología para averiguar si los AcMs podrían potencialmente tener alguna utilidad como herramientas en terapia. Para ello, estudiamos un modelo de

adhesión de células tumorales a monocapas de células endoteliales, etapa clave en el proceso de extravasación de las células tumorales durante su diseminación y metástasis. Observamos que la presencia de los AcMs 2A10 y YES-2 disminuye la adhesión de las células tumorales de col carcinoma de colon (Colo320) y de adenocarcinoma de ovario (SKOV-3) a las células endoteliales EA-hy926, del mismo modo que observábamos en las adhesiones a ADAM-17-Fc y a fibronectina. Por lo tanto, estos anticuerpos podrían tener potencialmente alguna utilidad como herramientas para modular la capacidad adhesiva de ADAM-17 en la extravasación de tumores a través del endotelio.

Todos los miembros de la familia ADAM contienen un dominio desintegrina que es potencialmente capaz de unirse a integrinas y, por lo tanto, dicha interacción es importante en el proceso de adhesión celular (Takeda et al., 2006). Concretamente, nosotros hemos analizado los efectos que provocan nuestros AcMs, al unirse a ADAM-17 a través del dominio desintegrina, en la interacción celular entre la integrina $\alpha_5\beta_1$ a ADAM-17. Dado que el dominio desintegrina está próximo al dominio catalítico de las ADAMs, es posible que la unión de los AcMs al dominio desintegrina pueda ejercer un efecto sobre **la actividad *sheddas* de ADAM-17**.

Para estudiar los efectos de los AcMs 2A10 y YES-2, en la actividad *sheddas* de ADAM-17 seleccionamos dos sustratos de la enzima: ALCAM y TNF- α . Los datos obtenidos sugieren que la presencia de los AcMs aumenta la liberación de la forma soluble de ambos sustratos, siendo el efecto del AcM YES-2 más evidente que el efecto del AcM 2A10. Incluso para el sustrato ALCAM, no se observa prácticamente ningún efecto del AcM 2A10 sobre la liberación de la forma soluble. Por lo tanto, la unión de los AcMs a ADAM-17 parece aumentar su capacidad *sheddas*. Después de analizar los resultados de las adhesiones celulares y teniendo en cuenta que en el reconocimiento del sustrato participan el dominio próximo a la membrana y el dominio transmembrana, estos dos dominios pueden verse afectados por la unión de los anticuerpos al dominio desintegrina, es decir, se puede transmitir un cambio en la estructura de los dominios, y, de este modo, promover/facilitar el reconocimiento del sustrato y desencadenar un aumento en la actividad *sheddas*.

Como hemos comprobado a lo largo de la realización de esta tesis, la regulación de la actividad de ADAM-17 es compleja y se produce a distintos niveles, siendo indispensable para prevenir la actividad incontrolada de la enzima que daría lugar a situaciones patológicas. Por este motivo resulta tan importante descubrir los mecanismos que controlan dicha regulación. Para contribuir a este objetivo, hemos resumido los efectos observados de los AcMs 2A10 y YES-2 en la regulación de la actividad de ADAM-17 (**Figura 28**) y los hemos integrado con los

resultados obtenidos en este campo de investigación que recientemente han sido revisados en una publicación científica (Grotzinger et al., 2017).

En el esquema hemos querido mostrar los posibles efectos de los anticuerpos en las principales funciones de ADAM-17:

- 1. La capacidad adhesiva:** los AcMs 2A10 y YES-2 inhiben la interacción entre $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17. Los AcMs se unen al dominio desintegrina de la enzima, que es el mismo dominio por el que interacciona con la integrina. De este modo, la unión de los anticuerpos podría provocar un impedimento estérico en la interacción de ADAM-17 con la integrina $\alpha_5\beta_1$, observándose experimentalmente una inhibición de la adhesión celular mediada por esta integrina a ADAM-17-Fc inmovilizado sobre el sustrato. Cuando estudiamos la interacción de la integrina y la enzima en *cis* (experimentos de adhesión celular a ADAM-17-Fc preincubando con los anticuerpos sólo las células o de adhesión a fibronectina) también observamos una inhibición de la adhesión. En este último caso, la integrina no podría asociarse a ADAM-17 por el dominio desintegrina puesto que estaría ocupado por los anticuerpos, lo que permitiría, teóricamente, que la integrina $\alpha_5\beta_1$ estuviese más libre para interaccionar con sus sustratos (ADAM-17-Fc y fibronectina). Este aumento de la integrina libre no desencadena un aumento de la adhesión, sino una inhibición que posiblemente sea causada por un cambio en el estado de agregación de la integrina (avidez).
- 2. La actividad *sheddas*:** la unión de los AcMs a ADAM-17 podría promover cambios en la conformación de la enzima que aumenten su actividad *sheddas*, de forma que se aumenta la liberación de los sustratos en su forma soluble (ALCAM y TNF- α). El efecto que ejercen los AcMs sugiere que su unión al dominio desintegrina conduce a la conformación abierta del dominio próximo a la membrana (que permite que el motivo CANDIS, presente en este dominio, se una a la fosfatidilserina de la superficie celular), promoviendo el reconocimiento del sustrato y con ello su procesamiento proteolítico.

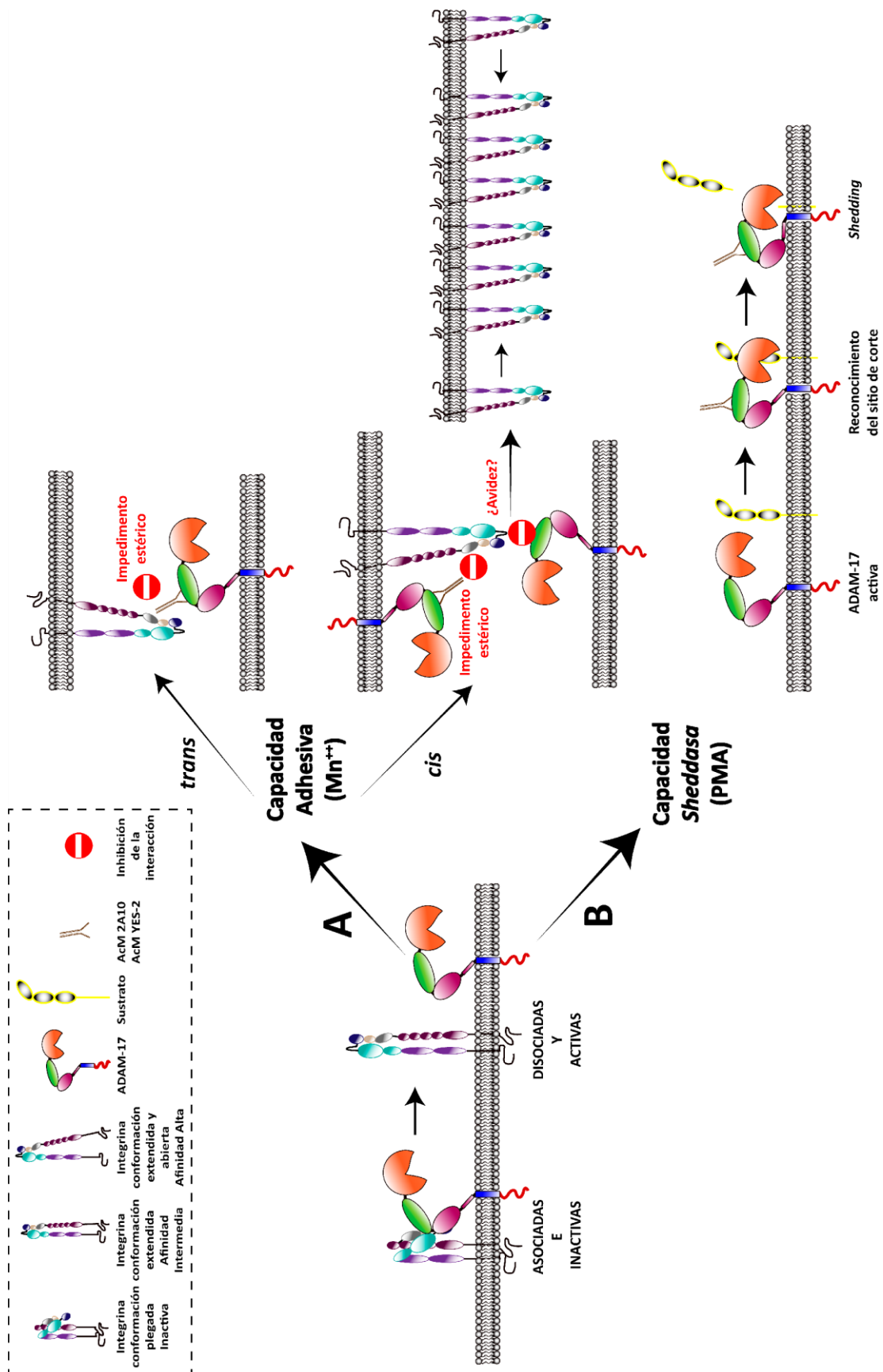


Figura 28. Esquema de los posibles efectos que ejercen los AcMs 2A10 y YES-2, en los principales procesos biológicos regulados por ADAM-17. A) Capacidad Adhesiva. La unión de los AcMs 2A10 y YES-2 al dominio desintegrina de ADAM-17, podría provocar un impedimento estérico, al no observar interacción entre la integrina $\alpha_5\beta_1$ y ADAM-17 en presencia de los AcMs. Por lo tanto, la adhesión mediada por la interacción de ambas moléculas (en *trans* y en *cis*) se inhibe en presencia de los AcMs. Para explicar la inhibición de la interacción en *cis* entre la integrina y la enzima, sugerimos que a pesar de estar ocupado el dominio desintegrina de ADAM-17 con los AcMs, la integrina no está más disponible para unirse a sus sustratos, posiblemente por un cambio en el estado de la agregación de la integrina. **B) Capacidad Sheddasa.** Los AcMs 2A10 y YES-2 al unirse al dominio desintegrina de ADAM-17, pueden promover cambios en la conformación de la enzima permitiendo que el dominio próximo a la membrana esté en la conformación abierta, y así, el motivo CANDIS se una a las fosfatidilserinas de la membrana plasmática y se desencadene el reconocimiento del sustrato y con ello, el procesamiento proteolítico de sus sustratos.

A vertical bar on the left side of the page with a gradient from light gray at the top to dark red at the bottom, ending in a solid black square.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos en esta tesis hemos elaborado las siguientes conclusiones:

1. Hemos obtenidos dos anticuerpos monoclonales específicos frente a ADAM-17, denominados 2A10 y YES-2, que poseen distinta afinidad de unión a la enzima.
2. Los anticuerpos monoclonales 2A10 y YES-2 se unen a epítopos localizados en el dominio desintegrina de ADAM-17. Estos epítopos son dependientes de la conformación de ADAM-17.
3. Los anticuerpos 2A10 y YES-2 inhiben la adhesión celular mediada por la interacción de la integrina $\alpha_5\beta_1$ a dos de sus ligandos (ADAM-17 y fibronectina) en diferentes líneas celulares tumorales y leucocitarias.
4. En nuestro modelo de adhesión de células tumorales al endotelio humano, los anticuerpos ejercen un papel potencialmente relevante al disminuir la adhesión en este proceso celular.
5. Los anticuerpos 2A10 y YES-2 aumentan la capacidad proteolítica de ADAM-17 en el procesamiento de dos de sus sustratos (ALCAM y TNF- α), observándose un mayor *shedding* de ambos sustratos en linfocitos B y células monocíticas.

A vertical bar on the left side of the page with a gradient from light gray at the top to dark brown at the bottom, ending in a solid black square.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adrain, C., M. Zettl, Y. Christova, N. Taylor, and M. Freeman. 2012. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science*. 335:225-228.
- Akatsu, T., M. Nakamura, M. Satoh, and K. Hiramori. 2003. Increased mRNA expression of tumour necrosis factor-alpha and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 105:39-44.
- Amour, A., P.M. Slocombe, A. Webster, M. Butler, C.G. Knight, B.J. Smith, P.E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knauper, A.J. Docherty, and G. Murphy. 1998. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett*. 435:39-44.
- Arduise, C., T. Abache, L. Li, M. Billard, A. Chabanon, A. Ludwig, P. Mauduit, C. Boucheix, E. Rubinstein, and F. Le Naour. 2008. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol*. 181:7002-7013.
- Arribas, J., L. Coodly, P. Vollmer, T.K. Kishimoto, S. Rose-John, and J. Massague. 1996. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem*. 271:11376-11382.
- Arribas, J., and C. Esselens. 2009. ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases. *Curr Pharm Des*. 15:2319-2335.
- Arribas, J., F. Lopez-Casillas, and J. Massague. 1997. Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J Biol Chem*. 272:17160-17165.
- Arroyo, A.G., P. Sanchez-Mateos, M.R. Campanero, I. Martin-Padura, E. Dejana, and F. Sanchez-Madrid. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit. *J Cell Biol*. 117:659-670.
- Bax, D.V., A.J. Messent, J. Tart, M. van Hoang, J. Kott, R.A. Maciewicz, and M.J. Humphries. 2004. Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem*. 279:22377-22386.
- Berendt, A.R., A. McDowall, A.G. Craig, P.A. Bates, M.J. Sternberg, K. Marsh, C.I. Newbold, and N. Hogg. 1992. The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell*. 68:71-81.
- Bergbold, N., and M.K. Lemberg. 2013. Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1828:2840-2848.
- Black, R.A. 2002. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol*. 34:1-5.
- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 385:729-733.
- Black, R.A., and J.M. White. 1998. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*. 10:654-659.
- Blaydon, D.C., P. Biancheri, W.L. Di, V. Plagnol, R.M. Cabral, M.A. Brooke, D.A. van Heel, F. Ruschendorf, M. Toynbee, A. Walne, E.A. O'Toole, J.E. Martin, K. Lindley, T. Vulliamy, D.J. Abrams, T.T. MacDonald, J.I. Harper, and D.P. Kelsell. 2011. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med*. 365:1502-1508.
- Blobel, C.P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:32-43.

- Borrell-Pages, M., F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga, and J. Arribas. 2003. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *Embo J.* 22:1114-1124.
- Bzowska, M., N. Jura, A. Lassak, R.A. Black, and J. Bereta. 2004. Tumour necrosis factor- α stimulates expression of TNF- α converting enzyme in endothelial cells. *Eur J Biochem.* 271:2808-2820.
- Campanero, M.R., A.G. Arroyo, R. Pulido, A. Ursa, M.S. de Matias, P. Sanchez-Mateos, P.D. Kassner, B.M. Chan, M.E. Hemler, A.L. Corbi, and et al. 1992. Functional role of α 2/ β 1 and α 4/ β 1 integrins in leukocyte intercellular adhesion induced through the common β 1 subunit. *Eur J Immunol.* 22:3111-3119.
- Canault, M., K. Certel, D. Schatzberg, D.D. Wagner, and R.O. Hynes. 2010. The lack of ADAM17 activity during embryonic development causes hemorrhage and impairs vessel formation. *PLoS one.* 5:e13433.
- Canault, M., E. Tellier, B. Bonardo, E. Mas, M. Aumailley, I. Juhan-Vague, G. Nalbone, and F. Peiretti. 2006. FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity. *J Cell Physiol.* 208:363-372.
- Clarke, H.R., M.F. Wolfson, C.T. Rauch, B.J. Castner, C.P. Huang, M.J. Gerhart, R.S. Johnson, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, V.L. Price, and R.A. Black. 1998. Expression and purification of correctly processed, active human TACE catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.* 13:104-110.
- Chang, C., and Z. Werb. 2001. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 11:S37-43.
- DeClerck, Y.A. 2000. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer.* 36:1258-1268.
- Delneste, Y., P. Jeannin, L. Potier, P. Romero, and J.Y. Bonnefoy. 1997. N-acetyl-L-cysteine exhibits antitumoral activity by increasing tumor necrosis factor α -dependent T-cell cytotoxicity. *Blood.* 90:1124-1132.
- Diaz-Rodriguez, E., J.C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste, and A. Pandiella. 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor α -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell.* 13:2031-2044.
- Doedens, J.R., and R.A. Black. 2000. Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem.* 275:14598-14607.
- Doedens, J.R., R.M. Mahimkar, and R.A. Black. 2003. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochemical and biophysical research communications.* 308:331-338.
- Dombernowsky, S.L., J. Samsoe-Petersen, C.H. Petersen, R. Instrell, A.M. Hedegaard, L. Thomas, K.M. Atkins, S. Auclair, R. Albrechtsen, K.J. Mygind, C. Frohlich, M. Howell, P. Parker, G. Thomas, and M. Kveiborg. 2015. The sorting protein PACS-2 promotes ErbB signalling by regulating recycling of the metalloproteinase ADAM17. *Nature communications.* 6:7518.
- Dransfield, I., C. Cabañas, J. Barrett, and N. Hogg. 1992. Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. *J Cell Biol.* 116:1527-1535.
- Dreymueller, D., and A. Ludwig. 2016. Considerations on inhibition approaches for proinflammatory functions of ADAM proteases. *Platelets*:1-8.
- Duffy, M.J., E. McKiernan, N. O'Donovan, and P.M. McGowan. 2009a. Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin Cancer Res.* 15:1140-1144.
- Duffy, M.J., E. McKiernan, N. O'Donovan, and P.M. McGowan. 2009b. The role of ADAMs in disease pathophysiology. *Clin Chim Acta.* 403:31-36.
- Dusterhoft, S., K. Hobel, M. Oldefest, J. Lokau, G.H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, I. Lorenzen, and J. Grotzinger. 2014. A disintegrin and metalloprotease 17

- dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *J Biol Chem.* 289:16336-16348.
- Dusterhoft, S., S. Jung, C.W. Hung, A. Tholey, F.D. Sonnichsen, J. Grotzinger, and I. Lorenzen. 2013. Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc.* 135:5776-5781.
- Dusterhoft, S., M. Michalek, F. Kordowski, M. Oldefest, A. Sommer, J. Roseler, K. Reiss, J. Grotzinger, and I. Lorenzen. 2015. Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity. *Biochemistry.* 54:5791-5801.
- Ebsen, H., A. Schroder, D. Kabelitz, and O. Janssen. 2013. Differential surface expression of ADAM10 and ADAM17 on human T lymphocytes and tumor cells. *PLoS one.* 8:e76853.
- Edwards, D.R., M.M. Handsley, and C.J. Pennington. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 29:258-289.
- Endres, K., A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz, and R. Postina. 2003. Tumor necrosis factor- α converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem.* 270:2386-2393.
- Gilsanz, A., L. Sanchez-Martin, M.D. Gutierrez-Lopez, S. Ovalle, Y. Machado-Pineda, R. Reyes, G.W. Swart, C.G. Figdor, E.M. Lafuente, and C. Cabanas. 2013. ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci.* 70:475-493.
- Gonzales, P.E., J.D. Galli, and M.E. Milla. 2008. Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry.* 47:9911-9919.
- Gonzales, P.E., A. Solomon, A.B. Miller, M.A. Leesnitzer, I. Sagi, and M.E. Milla. 2004. Inhibition of the tumor necrosis factor- α -converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem.* 279:31638-31645.
- Gooz, M. 2010. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45:146-169.
- Gooz, P., Y. Dang, S. Higashiyama, W.O. Twal, C.J. Haycraft, and M. Gooz. 2012. A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 5 \beta 1$ integrin in kidney mesangial cells. *PLoS one.* 7:e33350.
- Gooz, P., M. Gooz, A. Baldys, and S. Hoffman. 2009. ADAM-17 regulates endothelial cell morphology, proliferation, and in vitro angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications.* 380:33-38.
- Groth, E., J. Pruessmeyer, A. Babendreyer, J. Schumacher, T. Pasqualon, D. Dreymueller, S. Higashiyama, I. Lorenzen, J. Grotzinger, D. Cataldo, and A. Ludwig. 2016. Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochimica et biophysica acta.* 1863:2795-2808.
- Grotzinger, J., I. Lorenzen, and S. Dusterhoft. 2017. Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochimica et biophysica acta.*
- Gruarin, P., L. Primo, C. Ferrandi, F. Bussolino, N.N. Tandon, P. Arese, D. Ulliers, and M. Alessio. 2001. Cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is mediated by a redox-dependent conformational fraction of CD36. *J Immunol.* 167:6510-6517.
- Gutierrez-Lopez, M.D., A. Gilsanz, M. Yanez-Mo, S. Ovalle, E.M. Lafuente, C. Dominguez, P.N. Monk, I. Gonzalez-Alvaro, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2011. The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell Mol Life Sci.* 68:3275-3292.
- Gutierrez-Lopez, M.D., S. Ovalle, M. Yanez-Mo, N. Sanchez-Sanchez, E. Rubinstein, N. Olmo, M.A. Lizarbe, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2003. A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated $\beta 1$ integrin. *J Biol Chem.* 278:208-218.

- Hinkle, C.L., S.W. Sunnarborg, D. Loisel, C.E. Parker, M. Stevenson, W.E. Russell, and D.C. Lee. 2004. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem.* 279:24179-24188.
- Howard, L., X. Lu, S. Mitchell, S. Griffiths, and P. Glynn. 1996. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J.* 317 (Pt 1):45-50.
- Itai, T., M. Tanaka, and S. Nagata. 2001. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur J Biochem.* 268:2074-2082.
- Jones, J.C., S. Rustagi, and P.J. Dempsey. 2016. ADAM Proteases and Gastrointestinal Function. *Annu Rev Physiol.* 78:243-276.
- Kawahara, R., D.C. Granato, S. Yokoo, R.R. Domingues, D.M. Trindade, and A.F. Paes Leme. 2017. Mass spectrometry-based proteomics revealed Glypican-1 as a novel ADAM17 substrate. *J Proteomics.* 151:53-65.
- Khokha, R., A. Murthy, and A. Weiss. 2013. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13:649-665.
- Kohler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-497.
- Le Gall, S.M., T. Maretzky, P.D. Issuree, X.D. Niu, K. Reiss, P. Saftig, R. Khokha, D. Lundell, and C.P. Blobel. 2010. ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci.* 123:3913-3922.
- Lee, M.H., M. Rapti, and G. Murphy. 2005. Total conversion of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) for specific metalloproteinase targeting: fine-tuning TIMP-4 for optimal inhibition of tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *J Biol Chem.* 280:15967-15975.
- Leeuwenberg, J.F., E.F. Smeets, J.J. Neefjes, M.A. Shaffer, T. Cinek, T.M. Jeunhomme, T.J. Ahern, and W.A. Buurman. 1992. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology.* 77:543-549.
- Leonard, J.D., F. Lin, and M.E. Milla. 2005. Chaperone-like properties of the prodomain of TNF α -converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem J.* 387:797-805.
- Li, N., K. Boyd, P.J. Dempsey, and D.A. Vignali. 2007. Non-cell autonomous expression of TNF-alpha-converting enzyme ADAM17 is required for normal lymphocyte development. *J Immunol.* 178:4214-4221.
- Li, X., T. Maretzky, J.M. Perez-Aguilar, S. Monette, G. Weskamp, S. Le Gall, B. Beutler, H. Weinstein, and C.P. Blobel. 2017. Structural modeling defines transmembrane residues in ADAM17 that are crucial for Rhbdf2/ADAM17-dependent proteolysis. *J Cell Sci.*
- Lisi, S., M. D'Amore, and M. Sisto. 2014. ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity. *Immunol Lett.* 162:159-169.
- Lorenzen, I., J. Lokau, S. Dusterhoft, A. Trad, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, and J. Grotzinger. 2012. The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett.* 586:1093-1100.
- Lorenzen, I., J. Lokau, Y. Korpys, M. Oldefest, C.M. Flynn, U. Kunzel, C. Garbers, M. Freeman, J. Grotzinger, and S. Dusterhoft. 2016. Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Sci Rep.* 6:35067.
- Luque, A., M. Gomez, W. Puzon, Y. Takada, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 1996. Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem.* 271:11067-11075.

- Maskos, K., C. Fernandez-Catalan, R. Huber, G.P. Bourenkov, H. Bartunik, G.A. Ellestad, P. Reddy, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, B.J. Castner, R. Davis, H.R. Clarke, M. Petersen, J.N. Fitzner, D.P. Cerretti, C.J. March, R.J. Paxton, R.A. Black, and W. Bode. 1998. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:3408-3412.
- Matthews, A.L., P.J. Noy, J.S. Reyat, and M.G. Tomlinson. 2016. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets*:1-9.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K.J. Kallen, and S. Rose-John. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem*. 278:38829-38839.
- McGowan, P.M., B.M. Ryan, A.D. Hill, E. McDermott, N. O'Higgins, and M.J. Duffy. 2007. ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin Cancer Res*. 13:2335-2343.
- Mezyk, R., M. Bzowska, and J. Bereta. 2003. Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Acta Biochim Pol*. 50:625-645.
- Milla, M.E., M.A. Leesnitzer, M.L. Moss, W.C. Clay, H.L. Carter, A.B. Miller, J.L. Su, M.H. Lambert, D.H. Willard, D.M. Sheeley, T.A. Kost, W. Burkhart, M. Moyer, R.K. Blackburn, G.L. Pahel, J.L. Mitchell, C.R. Hoffman, and J.D. Becherer. 1999. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem*. 274:30563-30570.
- Moore, C.S., and S.J. Crocker. 2012. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am J Pathol*. 180:12-16.
- Moss, M.L., S.L. Jin, M.E. Milla, D.M. Bickett, W. Burkhart, H.L. Carter, W.J. Chen, W.C. Clay, J.R. Didsbury, D. Hassler, C.R. Hoffman, T.A. Kost, M.H. Lambert, M.A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L.K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J.L. Su, J.D. Becherer, and et al. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*. 385:733-736.
- Moss, M.L., J.M. White, M.H. Lambert, and R.C. Andrews. 2001. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today*. 6:417-426.
- Mould, A.P., S.J. Barton, J.A. Askari, P.A. McEwan, P.A. Buckley, S.E. Craig, and M.J. Humphries. 2003. Conformational changes in the integrin beta A domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement. *J Biol Chem*. 278:17028-17035.
- Mullberg, J., K. Althoff, T. Jostock, and S. Rose-John. 2000. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw*. 11:27-38.
- Mullooly, M., P. McGowan, J. Crown, and M.J. Duffy. 2016. The ADAMs Family of Proteases as Targets for the Treatment of Cancer. *Cancer Biol Ther*:0.
- Murphy, G. 2011. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*. 12:233.
- Murumkar, P.R., S. DasGupta, S.R. Chandani, R. Giridhar, and M.R. Yadav. 2010. Novel TACE inhibitors in drug discovery: a review of patented compounds. *Expert Opin Ther Pat*. 20:31-57.
- Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara, and H. Saya. 2004. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol*. 165:893-902.
- Okamoto, T., S. Iwata, H. Yamazaki, R. Hatano, E. Komiya, N.H. Dang, K. Ohnuma, and C. Morimoto. 2014. CD9 negatively regulates CD26 expression and inhibits CD26-mediated enhancement of invasive potential of malignant mesothelioma cells. *PloS one*. 9:e86671.

- Ovalle, S., M.D. Gutierrez-Lopez, N. Olmo, J. Turnay, M.A. Lizarbe, P. Majano, F. Molina-Jimenez, M. Lopez-Cabrera, M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2007. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 121:2140-2152.
- Peiretti, F., M. Canault, P. Deprez-Beauclair, V. Berthet, B. Bonardo, I. Juhan-Vague, and G. Nalbone. 2003. Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp Cell Res*. 285:278-285.
- Peng, L., K. Cook, L. Xu, L. Cheng, M. Damschroder, C. Gao, H. Wu, and W.F. Dall'Acqua. 2016. Molecular basis for the mechanism of action of an anti-TACE antibody. *MAbs*. 8:1598-1605.
- Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March, and R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 282:1281-1284.
- Primakoff, P., and D.G. Myles. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet*. 16:83-87.
- Qian, M., X. Shen, and H. Wang. 2015. The Distinct Role of ADAM17 in APP Proteolysis and Microglial Activation Related to Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*.
- Reddy, P., J.L. Slack, R. Davis, D.P. Cerretti, C.J. Kozlosky, R.A. Blanton, D. Shows, J.J. Peschon, and R.A. Black. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*. 275:14608-14614.
- Reiss, K., and P. Saftig. 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*. 20:126-137.
- Reyes, R., A. Monjas, M. Yanez-Mo, B. Cardenes, G. Morlino, A. Gilsanz, Y. Machado-Pineda, E. Lafuente, P. Monk, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2015. Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanin CD9. *Biochimica et biophysica acta*. 1853:2464-2480.
- Riethmueller, S., P. Somasundaram, J.C. Ehlers, C.W. Hung, C.M. Flynn, J. Lokau, M. Agthe, S. Dusterhoft, Y. Zhu, J. Grotzinger, I. Lorenzen, T. Koudelka, K. Yamamoto, U. Pickhinke, R. Wichert, C. Becker-Pauly, M. Radisch, A. Albrecht, M. Hessefort, D. Stahnke, C. Unverzagt, S. Rose-John, A. Tholey, and C. Garbers. 2017. Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation. *PLoS Biol*. 15:e2000080.
- Rose-John, S. 2013. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol Res*. 71:19-22.
- Saftig, P., and K. Reiss. 2011. The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*. 90:527-535.
- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John. 2011. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends in immunology*. 32:380-387.
- Schlondorff, J., J.D. Becherer, and C.P. Blobel. 2000. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J*. 347 Pt 1:131-138.
- Schlondorff, J., and C.P. Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*. 112 (Pt 21):3603-3617.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*. 17:7-30.
- Seifert, T., B.C. Kieseier, S. Ropele, S. Strasser-Fuchs, F. Quehenberger, F. Fazekas, and H.P. Hartung. 2002. TACE mRNA expression in peripheral mononuclear cells precedes new lesions on MRI in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 8:447-451.
- Sinnathamby, G., J. Zerfass, J. Hafner, P. Block, Z. Nickens, A. Hobeika, A.A. Secord, H.K. Lyster, M.A. Morse, and R. Philip. 2011. ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17) is naturally processed through major histocompatibility complex (MHC) class I molecules

- and is a potential immunotherapeutic target in breast, ovarian and prostate cancers. *Clin Exp Immunol.* 163:324-332.
- Smalley, D.M., and K. Ley. 2005. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 9:255-266.
- Sommer, A., F. Kordowski, J. Buch, T. Maretzky, A. Evers, J. Andra, S. Dusterhoft, M. Michalek, I. Lorenzen, P. Somasundaram, A. Tholey, F.D. Sonnichsen, K. Kunzelmann, L. Heinbockel, C. Nehls, T. Gutschmann, J. Grotzinger, S. Bhakdi, and K. Reiss. 2016. Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nature communications.* 7:11523.
- Srour, N., A. Lebel, S. McMahon, I. Fournier, M. Fugere, R. Day, and C.M. Dubois. 2003. TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett.* 554:275-283.
- Takeda, S., T. Igarashi, H. Mori, and S. Araki. 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *Embo J.* 25:2388-2396.
- Tellier, E., M. Canault, L. Rebsomen, B. Bonardo, I. Juhan-Vague, G. Nalbone, and F. Peiretti. 2006. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res.* 312:3969-3980.
- Trad, A., N. Hedemann, M. Shomali, V. Pawlak, J. Grotzinger, and I. Lorenzen. 2011. Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17. *J Immunol Methods.* 371:91-96.
- Trad, A., M. Riese, M. Shomali, N. Hedeman, T. Effenberger, J. Grotzinger, and I. Lorenzen. 2013. The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblastcarcinoma cell interactions. *International journal of oncology.* 42:1793-1800.
- Tsukamoto, S., M. Takeuchi, T. Kawaguchi, E. Togasaki, A. Yamazaki, Y. Sugita, T. Muto, S. Sakai, Y. Takeda, C. Ohwada, E. Sakaida, N. Shimizu, K. Nishii, M. Jiang, K. Yokote, H. Bujo, and C. Nakaseko. 2014. Tetraspanin CD9 modulates ADAM17-mediated shedding of LR11 in leukocytes. *Exp Mol Med.* 46:e89.
- Tucher, J., D. Linke, T. Koudelka, L. Cassidy, C. Tredup, R. Wichert, C. Pietrzik, C. Becker-Pauly, and A. Tholey. 2014. LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10 and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries. *J Proteome Res.* 13:2205-2214.
- Van Wart, H.E., and H. Birkedal-Hansen. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:5578-5582.
- Verset, L., J. Tommelein, C. Decaestecker, E. De Vlieghere, M. Bracke, I. Salmon, O. De Wever, and P. Demetter. 2017. ADAM-17/FHL2 colocalisation suggests interaction and role of these proteins in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 39:1010428317695024.
- Wang, K.Y., N. Arima, S. Higuchi, S. Shimajiri, A. Tanimoto, Y. Murata, T. Hamada, and Y. Sasaguri. 2000. Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages. *FEBS Lett.* 473:345-348.
- Wang, Y., A.H. Herrera, Y. Li, K.K. Belani, and B. Walcheck. 2009. Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding. *J Immunol.* 182:2449-2457.
- Wayner, E.A., A. Garcia-Pardo, M.J. Humphries, J.A. McDonald, and W.G. Carter. 1989. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol.* 109:1321-1330.
- Willems, S.H., C.J. Tape, P.L. Stanley, N.A. Taylor, I.G. Mills, D.E. Neal, J. McCafferty, and G. Murphy. 2010. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J.* 428:439-450.
- Wisniewska, M., P. Goettig, K. Maskos, E. Belouski, D. Winters, R. Hecht, R. Black, and W. Bode. 2008. Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex. *J Mol Biol.* 381:1307-1319.

- Wolfsberg, T.G., P.D. Straight, R.L. Gerena, A.P. Huovila, P. Primakoff, D.G. Myles, and J.M. White. 1995. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol.* 169:378-383.
- Wong, E., T. Cohen, E. Romi, M. Levin, Y. Peleg, U. Arad, A. Yaron, M.E. Milla, and I. Sagi. 2016. Harnessing the natural inhibitory domain to control TNFalpha Converting Enzyme (TACE) activity in vivo. *Sci Rep.* 6:35598.
- Wong, E., T. Maretzky, Y. Peleg, C.P. Blobel, and I. Sagi. 2015. The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *J Biol Chem.* 290:12135-12146.
- Xu, J., S. Mukerjee, C.R. Silva-Alves, A. Carvalho-Galvao, J.C. Cruz, C.M. Balarini, V.A. Braga, E. Lazartigues, and M.S. Franca-Silva. 2016. A Disintegrin and Metalloprotease 17 in the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Front Physiol.* 7:469.
- Xu, P., and R. Derynck. 2010. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular cell.* 37:551-566.
- Yanez-Mo, M., A. Alfranca, C. Cabanas, M. Marazuela, R. Tejedor, M.A. Ursa, L.K. Ashman, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1998. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol.* 141:791-804.
- Yanez-Mo, M., O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdes, and F. Sanchez-Madrid. 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19:434-446.
- Yanez-Mo, M., M.D. Gutierrez-Lopez, and C. Cabanas. 2011. Functional interplay between tetraspanins and proteases. *Cell Mol Life Sci.* 68:3323-3335.

ANEXO

ANEXO

Lista de artículos publicados durante el desarrollo de esta Tesis:

1. Reyes R, Monjas A, Yáñez-Mó M, Cardeñes B, Morlino G, Gilsanz A, **Machado-Pineda Y**, Lafuente E, Monk P, Sánchez-Madrid F, Cabañas C. (2015). Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanin CD9. **Biochimica et Biophysica Acta. 1853**: 2464-80.
2. Gilsanz A, Sánchez-Martín L, Gutiérrez-López MD, Ovalle S, **Machado-Pineda Y**, Reyes R, Swart GW, Figdor CG, Lafuente EM, Cabañas C. (2013). ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9. **Cellular and Molecular Life Sciences. 70**: 475-93.

ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9

Alvaro Gilsanz · Lorena Sánchez-Martín · María Dolores Gutiérrez-López ·
Susana Ovalle · Yesenia Machado-Pineda · Raquel Reyes · Guido W. Swart ·
Carl G. Figdor · Esther M. Lafuente · Carlos Cabañas

Received: 23 January 2012/Revised: 20 July 2012/Accepted: 13 August 2012/Published online: 30 September 2012
© Springer Basel AG 2012

Abstract ALCAM/CD166 is a member of the immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules (Ig-CAMs) which mediates intercellular adhesion through either homophilic (ALCAM–ALCAM) or heterophilic (ALCAM–CD6) interactions. ALCAM-mediated adhesion is crucial in different physiological and pathological phenomena, with particular relevance in leukocyte extravasation, stabilization of the immunological synapse, T cell activation and proliferation and tumor growth and metastasis. Although the functional implications of ALCAM in these processes is well established, the mechanisms regulating its adhesive capacity remain

obscure. Using confocal microscopy colocalization, and biochemical and functional analyses, we found that ALCAM directly associates with the tetraspanin CD9 on the leukocyte surface in protein complexes that also include the metalloproteinase ADAM17/TACE. The functional relevance of these interactions is evidenced by the CD9-induced upregulation of both homophilic and heterophilic ALCAM interactions, as reflected by increased ALCAM-mediated cell adhesion and T cell migration, activation and proliferation. The enhancement of ALCAM function induced by CD9 is mediated by a dual mechanism involving (1) augmented clustering of ALCAM molecules, and (2) upregulation of ALCAM surface expression due to inhibition of ADAM17 shed-dase activity.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-012-1132-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Gilsanz · L. Sánchez-Martín · S. Ovalle ·
Y. Machado-Pineda · R. Reyes · C. Cabañas (✉)
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM),
Nicolás Cabrera 1, Campus de Cantoblanco,
28049 Madrid, Spain
e-mail: ccabanas@cbm.uam.es

M. D. Gutiérrez-López
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

G. W. Swart
Department of Biomolecular Chemistry, Faculty of Science,
Radboud University, Nijmegen, The Netherlands

C. G. Figdor
Department of Tumor Immunology, University Medical Centre,
Radboud University, Nijmegen, The Netherlands

E. M. Lafuente · C. Cabañas
Departamento de Microbiología I (Inmunología), Facultad de
Medicina, Universidad Complutense de Madrid,
28040 Madrid, Spain

Keywords ALCAM · CD166 · Tetraspanins · CD9 ·
ADAM17 · TACE

Abbreviations

ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
APC	Antigen-presenting cell
Ig-CAM	Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule
LEL	Large extracellular loop
mAb	Monoclonal antibody
MD-PBMCs	Monocyte-depleted peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
sALCAM	Soluble ALCAM
SEE	Staphylococcal enterotoxin E superantigen
shRNA	Small hairpin RNA
TBS	Tris-buffered saline
TNF- α	Tumor necrosis factor- α



Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanin CD9



Raquel Reyes^{a,b}, Alicia Monjas^a, María Yáñez-Mó^{c,d}, Beatriz Cardeños^a, Giulia Morlino^e, Alvaro Gilsanz^a, Yesenia Machado-Pineda^a, Esther Lafuente^f, Peter Monk^g, Francisco Sánchez-Madrid^{e,h}, Carlos Cabañas^{a,f,*}

^a Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), 28049 Madrid, Spain

^b Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

^c Unidad de Investigación, Hospital Santa Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP), 28006 Madrid, Spain

^d Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

^e Departamento de Biología Vascular e Inflamación, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), 28029 Madrid, Spain

^f Departamento de Microbiología I, Área de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^g University of Sheffield Medical School, Sheffield S10 2RX, UK

^h Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP), 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2014

Received in revised form 11 May 2015

Accepted 14 May 2015

Available online 21 May 2015

Keywords:

Tetraspanin

Integrin

CD9

LFA-1

Adhesion

Cytotoxicity

ABSTRACT

The tetraspanin CD9 has been shown to interact with different members of the $\beta 1$ and $\beta 3$ subfamilies of integrins, regulating through these interactions cell adhesion, migration and signaling. Based on confocal microscopy co-localization and on co-immunoprecipitation results, we report here that CD9 associates with the $\beta 2$ integrin LFA-1 in different types of leukocytes including T, B and monocytic cells. This association is resistant to stringent solubilization conditions which, together with data from chemical crosslinking, *in situ* Proximity Ligation Assays and pull-down experiments, suggest a primary/direct type of interaction mediated by the Large Extracellular Loop of the tetraspanin. CD9 exerts inhibitory effects on the adhesive function of LFA-1 and on LFA-1-dependent leukocyte cytotoxic activity. The mechanism responsible for this negative regulation exerted by CD9 on LFA-1 adhesion does not involve changes in the affinity state of this integrin but seems to be related to alterations in its state of aggregation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The $\beta 2$ subfamily of integrins comprises four distinct members, $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, and $\alpha D\beta 2$, that are selectively expressed on leukocytes (for review [15,28,33]). The integrin $\alpha L\beta 2$, also termed LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1) or CD11a/CD18 antigen, is expressed on most types of leukocytes and primarily on lymphocytes, whereas expression of the rest of members of this subfamily is rather restricted to myeloid cells. LFA-1 interacts with intercellular adhesion molecules (ICAM-1, -2, or -3), playing a pivotal role in many crucial leukocyte functions that require intercellular adhesion, such as extravasation into tissues, organization of the immune synapse and antigen presentation, inter-lymphocyte collaboration and killing of target cells by CTL or NK cells [2,40,63,66].

LFA-1 can exist in different states of activation regarding its ability to bind ligands. Resting T lymphocytes express LFA-1 with low affinity and avidity for ligands, necessary for their normal circulation in the blood as individual cells. However, activation by the TCR-CD3 complex or receptors for different cytokines and chemokines, results in rapid activation of LFA-1 enabling T cells to adhere to other cells [15,27,72]. Activation of LFA-1 can be induced through changes in the affinity of individual integrin molecules, reflecting conformational alterations, or through changes in the valency of interactions with multivalent ligands [18]. In terms of ligand binding affinity, at least three different conformational states of LFA-1 have been identified: a bent conformation of low affinity, an extended conformation with closed headpiece displaying intermediate affinity, and a high affinity extended conformation with open headpiece and separated intracellular tails [18,39]. PMA induces the intermediate affinity state but also increases the diffusion of LFA-1 molecules on the cell surface, which in the presence of multivalent ligand, leads to aggregation/clustering of this integrin [18,42]. On the other hand, extracellular Mn^{2+} induces the high affinity conformation of LFA-1 [18,26] but also induces changes in the local density (i.e. the

* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 911964513; fax: +34 911964420.
E-mail address: ccabanas@cbm.csic.es (C. Cabañas).

clustering) of integrin molecules, which is reflected by changes in the number of effective adhesive bonds (i.e. the valency) with ligand [19,55].

CD9 is a member of the tetraspanin family of integral membrane proteins [20,77] abundantly expressed on the surface of endothelial cells, some leukocytes and many types of tumor cells [21,36,64]. CD9 was initially characterized as a lympho-hematopoietic marker [14] and received the name “Motility-Regulatory Protein” (MRP) [49]. CD9 has been also implicated in the formation and maintenance of muscular myotubes [68], in nervous cell neurite outgrowth [61], and in sperm-oocyte fusion [23]. Like other tetraspanins, CD9 associates on the cell surface with different integrins and many of the functional effects that have been attributed to CD9 may be indeed related to its ability to associate to integrin molecules [6,7].

Functional interactions of CD9 with several members of the $\beta 1$ and $\beta 3$ subfamilies of integrins have been reported, usually based on the effects exerted by CD9-specific mAbs on the associated integrin-dependent adhesion, migration and signaling (reviewed in [6,7]). However, to our knowledge, only one published report includes some indication – merely based on co-immunoprecipitation evidence – suggestive of a possible interaction between CD9 and the $\beta 2$ integrin subunit [69], although this study did neither address the type or functional aspects of this interaction. In addition, functional association of LFA-1 with tetraspanins CD81 (the most closely related to CD9) and CD82, has been described on T lymphocytes [62,75], which prompted us to investigate in more detail whether CD9 is also functionally associated with the $\beta 2$ integrin LFA-1 on leukocytes.

We report here that CD9 associates directly with LFA-1 in different types of leukocytes and exerts inhibitory effects on its adhesive capacity and on leukocyte LFA-1-dependent cytotoxic activity.

2. Materials and methods

2.1. Cells and cell cultures

Primary T lymphoblasts were obtained from peripheral blood mononuclear cells from healthy donors treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin (Amersham Biosciences) for 48 h, as described previously [25,48]. Cells were then cultured for 7–10 days in RPMI-1640 containing 10% FBS and 50 U/ml IL-2 (Eurocetus). HSB-2 and Jurkat (T cell lines), JY and Daudi (B cell lines) and THP-1 and U937 cells (monocytic cell lines) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, antibiotics and glutamine. THP-1 and U937 differentiation into macrophage-like cells was induced with PMA (100 ng/ml) for 24 h.

2.2. Expression constructs and RNA silencing transfection

For stable transfection experiments, HSB-2 and U937 cells were electroporated with 20 μg pcDNA3-CD9 plasmid at 200 V (2×10 ms pulses in a 0.4 cm electroporation cuvette) using an ECM830 BTX electroporation system and selected with 1 mg/ml G418. For CD9 silencing, Jurkat cells were retrovirally transduced (OriGene Technologies) with the shRNA-coding plasmids TI356235 (the plasmid with the CD9 shRNA cassette insert) and TR20003 (“TR2” control plasmid without shRNA insert), according to manufacturer's indications and selected with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin.

2.3. Antibodies and reagents

ICAM-1-Fc chimeric protein consisting of the five domains of ICAM-1 fused to the Fc region of human IgG1 was prepared as described [9]. Anti- β -tubulin antibody was purchased from Sigma and the anti-CD18 biotin-conjugated antibody (MEM-48) from ImmunoTools. The antibodies anti- $\beta 2$ integrin Lia3/2 [17] and TS1/18 [58], anti- αL TP1/40 [17] and TS1/11 [58], anti- αM Bear-1 [41] and anti- αX HC1/1 [16], anti-CD9 VJ1/20 [78], PAINS-10 and PAINS-13 [31], anti-CD147 VJ1/9

and anti-CD59 VJ1/12 [78] and anti-HSPA8 PAINS-18 [29,31] were purified by protein A or protein-G affinity chromatography. The anti-CD81 5A6 mAb was kindly provided by Dr. Shoshana Levy (Stanford University School of Medicine, USA), the $\beta 2$ stimulatory mAb KIM185 by Dr. Martyn K. Robinson (UCB-Celltech., Slough, UK), the anti-CD105 mAb P4A4 by Dr. Carmelo Bernabeu (CIB-CSIC, Madrid, Spain) and the anti- $\beta 2$ mAb m24 by Dr. Nancy Hogg (Cancer Research UK, London, UK).

2.4. Flow cytometry analysis

For protein surface expression analysis cells were washed twice in RPMI-1640, incubated with primary antibodies at 4 °C for 30 min, followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) and fixed in 2% formaldehyde in PBS. For flow cytometric analysis of m24 epitope expression, HSB-2 and JK cells were washed in cation-free PBS and incubated for 15 min at 37 °C with Mn^{2+} (10, 20, 40, 100 and 400 μM) or with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (0.5 mM and 1 mM respectively) in the presence of mAb 24 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), washed and stained with secondary FITC-anti-mouse IgG. Fluorescence was measured using a FACScan™ flow cytometer (Beckton–Dickinson).

2.5. Immunofluorescence, confocal and TIRF microscopy

For immunofluorescence studies cells, treated or not with 0.4 mM Mn^{2+} for 20 min at 37 °C, were seeded on 12-mm glass coverslips coated with poly-L-lysine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were fixed in 2% paraformaldehyde, blocked in 1% BSA in TBS and incubated for 1 h with TS1/11 or TS1/18 mAbs (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), followed by secondary antibody Alexa Fluor™-594 anti-mouse IgG (Invitrogen), rabbit polyclonal anti-CD9 antibody H-110 (Santa Cruz Biotechnology) and Alexa Fluor™-488 anti-rabbit IgG (Invitrogen). For THP-1 cells, Fc receptors were saturated with human gammaglobulin for 30 min, prior to fixation. Samples were mounted with Mowiol reagent (Calbiochem) and images were obtained with a Zeiss LSM510 Meta inverted microscope. Fluorescence colocalization histograms and Pearson coefficient values were obtained using the Fiji plug-in “Intensity correlation analysis” [47,60]. Fiji software was also used for setting the threshold and for detection and quantitation of fluorescent objects.

For TIRF (total internal reflection fluorescence) microscopy, JK TR2 and JK shCD9 cells were first activated with PMA (200 ng/ml for 2 h), then plated onto ICAM-1-Fc-coated (14 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 35 mm Petri dishes with glass bottom (2.5×10^5 cells/plate), and incubated for 90 min at 37 °C to allow adhesion. After washing non-adhered cells with PBS, adhered cells were fixed in 2% paraformaldehyde (10 min, room temperature) and then permeabilized with 0.3% Triton-X100 in TBS buffer. Immunofluorescence staining of beta-2 integrin with mAb TS1/18 was performed as described above, and images were obtained with an inverted Olympus Xcellence IX83P2ZF TIRF microscopy system. Fiji software was used for setting the threshold and for detection and quantitation of fluorescence in clusters.

2.6. Co-immunoprecipitations

Co-immunoprecipitation experiments were performed using intact cells, in order to detect only surface protein–protein interactions. Cells were incubated for 15 min at 37 °C (or for 60 min at 4 °C in parallel control experiments) with the specific TS1/18 (anti- $\beta 2$) or VJ1/20 (anti-CD9) or control anti-CD105 and anti-CD59 antibodies in the presence of 0.5 mM Ca^{2+} /1 mM Mg^{2+} , followed by washing the antibody excess. Cells were then lysed for 15 min at 4 °C in TBS containing 1% Brij-97 or 1% Triton-X100 in the presence of corresponding extracellular cations and protease inhibitors and, after removal of insoluble material, incubated overnight at 4 °C with protein G-sepharose. Beads were then washed with 1:5 diluted lysis buffer, boiled in nonreducing Laemmli buffer, resolved by 8% (for $\beta 2$ detection) or 12% (for CD9)

SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked with 3% BSA and developed with the $\beta 2$ (MEM-48) or CD9 (VJ1/20) biotin-conjugated antibodies followed by streptavidin HRP (Thermo scientific) and ECL-chemiluminescence.

2.7. Covalent chemical cross-linking

THP-1/PMA and JY cells were extracted in 1% Brij97 lysis buffer (containing 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.5 mM CaCl_2 , 3 mM MgCl_2 and protease inhibitors), pH 7.4. After removal of insoluble material, lysates were treated with 0.25 mM thiol-cleavable cross-linker 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP) for 30 min at 4 °C. The cross-linking reaction was quenched for 15 min at room temperature with 10 mM glycine, pH 7.4, and then Triton X-100 was added to a final concentration of 1% (v/v) to cross-linked lysates and to parallel non-cross-linked lysates used as controls. Samples were immunoprecipitated with anti- $\beta 2$ integrin mAb TS1/18, with anti-CD9 mAb VJ1/20 or with anti-CD9 pAb (H110), as indicated, resolved by SDS-PAGE either under reducing conditions (to break the thiol bond in DTSSP-crosslinked protein complexes) or under non-reducing conditions and subsequent immunoblotting with biotinylated anti-CD9 (VJ1/20) or anti- $\beta 2$ integrin (MEM-48) mAbs, followed by streptavidin-HRP (Thermo Scientific) and ECL-chemiluminescence.

2.8. Pull-down assays

GST-fusion proteins containing the LEL region from human wt CD9, wt CD81 and wt CD63 were prepared as previously described [4,32,37]. JY and THP-1 cells were washed three times in PBS and either left untreated or their surface proteins biotinylated with 1 mM EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) in PBS with 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 for 30 min at 4 °C. Cells were then washed twice in PBS + 100 mM glycine to quench and remove excess biotin. Biotinylated and non-biotinylated cells were lysed in 1% Brij-97 or in 1% Triton-X100 buffer and incubated overnight at 4 °C with equal amounts of GST-fusion proteins, pulled down with glutathione-agarose for 3 h at 4 °C, washed in 1:10 diluted lysis buffer and boiled in non-reducing Laemmli buffer. For non-biotinylated cells, the presence of $\beta 2$ integrin in the pulled-down complexes was revealed by immunoblotting with biotinylated mAb MEM-48 and detection with streptavidin-HRP and ECL-chemiluminescence. The levels of pulled-down GST-fusion proteins were assessed by western-blot using an anti-GST rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology). For surface-biotinylated cells, all lysate proteins pulled-down by GST or by LEL-GST-CD9 were isolated with glutathione-sepharose beads and detected with streptavidin-HRP and ECL-chemiluminescence.

2.9. Cell adhesion assays

Static cell adhesion to ICAM-1-coated dishes was performed as described elsewhere [29,54]. 96-well flat-bottom plates were pre-coated with 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (for THP-1/PMA and T-lymphoblast cells) or 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (for JY, HSB2 and JK cells) of ICAM-1-Fc and blocked with 1% BSA. For PMA-stimulated cell adhesion, cells were incubated with 50 or 200 ng/ml of PMA in RPMI-1640 for 2 h at 37 °C. Cells were loaded with the fluorescent probe BCECF-AM (Sigma) and added (2×10^5 cells/well) in adhesion medium (Hepes 20 mM, NaCl 149 mM, 2 mg/ml glucose), stimulated with 0.5 mM Ca^{2+} /1 mM Mg^{2+} or 20–400 μM Mn^{2+} and

incubated for 20–60 min at 37 °C. When indicated, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-CD9 (VJ1/20, PAINS-10 and PAINS-13), anti- $\beta 2$ (Lia3/2 and KIM185) or the control anti-HSPA8 (PAINS-18) mAbs were pre-incubated with cells for 15 min at 4 °C before transferring the plates to 37 °C. The plates were then washed by gravity with warm PBS for 20 min at 37 °C. The percentage of adherent cells was calculated by determining their fluorescence in a microplate reader (TecanGENios), considering as 100% the total fluorescence of cells before washing. For determining cell adhesion under flow conditions, JK TR2 and JK shCD9 cells were first activated with PMA (100 ng/ml for 1 h) and labeled with CFSE or CMAC fluorescent probes and allowed to adhere for 15 min at 37 °C to immobilized ICAM-1 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Shear stress was started at 0.5 dyn/cm² and increased up to 20 dyn/cm² at 1 min intervals. Cell detachment was calculated by normalizing the number of adhered cells relative to the number of cells observed at the minimal flow rate of 0.5 dyn/cm².

2.10. Lymphokine-activated killer cell assay

The LAK cell assay was performed essentially as described [30,53] with 4×10^4 Daudi cells/well as targets and 4×10^5 T lymphoblasts as effector cells [25] in triplicates in 96-well U-bottom plates in a final volume of 200 μl . For antibody inhibition studies, purified mAbs were used at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Then the plates were incubated at 37 °C for 5 h and the percentage of specific target cytotoxicity was determined from the amount of LDH activity, measured as INT reduction, in the culture supernatant. 20 μl of lactate solution (Sigma, 36 mg/ml in 10 mM Tris buffer, pH 8.5) was added to the cell-free supernatant, followed by addition of 20 μl INT solution (Sigma, 2 mg/ml in PBS) and 20 μl of a solution containing NAD^+ /diaphorase (NAD^+ : Sigma, 3 mg/ml; diaphorase: Boehringer, 13.5 U/ml; BSA: 0.03%; sucrose: 1.2%; in PBS) and incubated for 20 min. The reaction was terminated with 20 μl of the LDH inhibitor oxamate (Sigma, 16.6 mg/ml in PBS) and the absorbance at 492 nm was determined in a microplate reader.

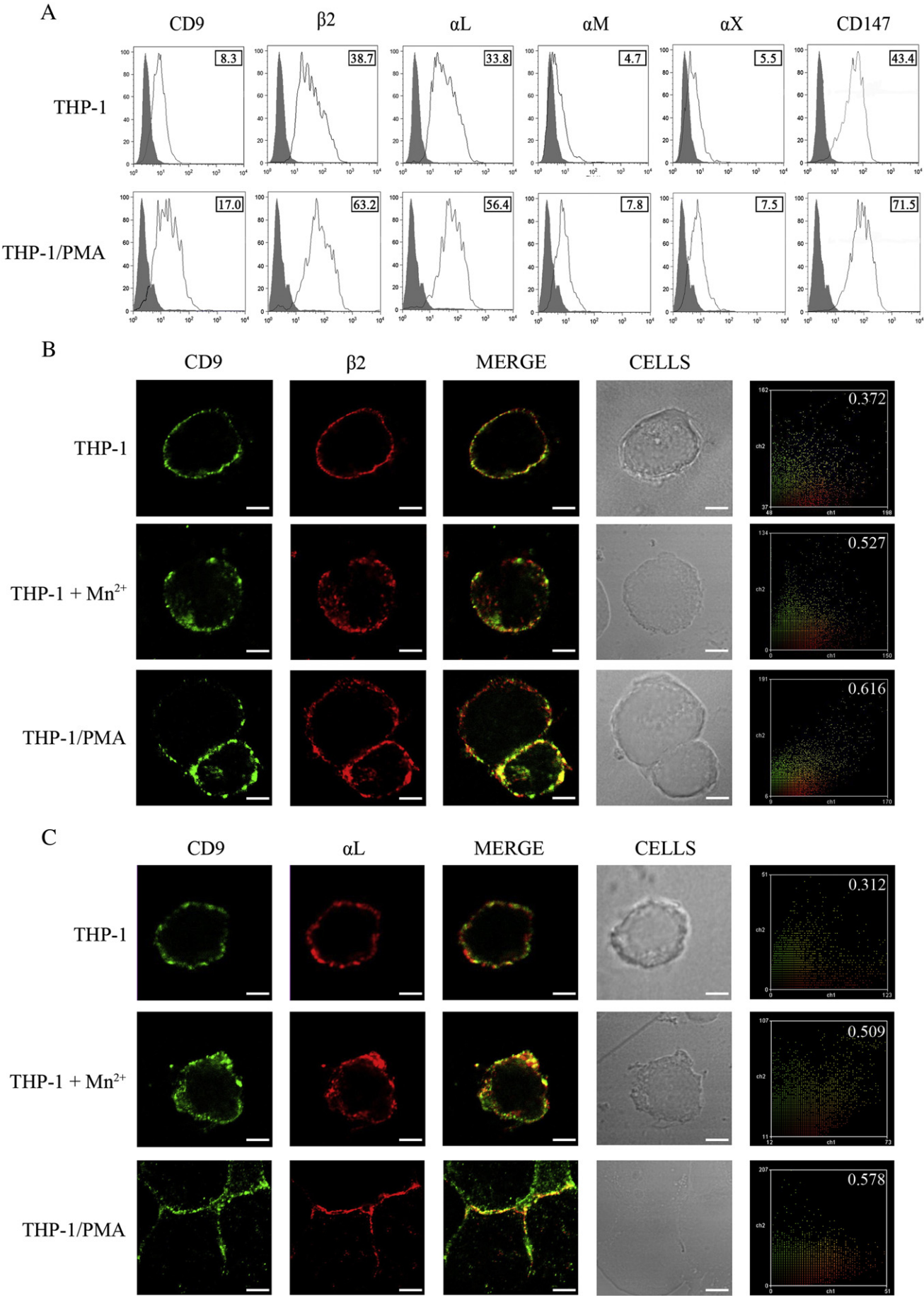
2.11. In situ proximity ligation assays

In situ proximity ligation assays (PLAs) (Duolink kit, Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) allows detection of direct or closely proximal protein–protein interactions in cell samples by fluorescence microscopy [65,76]. THP-1/PMA cells were seeded, fixed and blocked as described above. Next samples were incubated simultaneously with mouse mAbs anti- $\beta 2$ TS1/18, anti- αL TS1/11, anti-CD147 VJ1/9 or anti-CD81 5A6 mAbs, and with the anti-CD9 H-110 rabbit polyclonal antibody (sc-9148, Santa Cruz Biotechnology), followed by specific oligonucleotide-labeled secondary antibodies (anti-mouse-plus probe and anti-rabbit minus probe). Only if the two different target proteins are in close proximity (≤ 40 nm), the oligonucleotides of the two probes will hybridize and after a rolling-circle amplification reaction and detection with a different fluorescently labeled oligonucleotide a fluorescent dot signal can be visualized and analyzed by microscopy.

2.12. Statistical analysis

One-factor ANOVA analysis was performed using the statistics software SPSS (IBM). The data distribution was tested for normality by Bonferroni test.

Fig. 1. CD9 co-localizes with LFA-1 on THP-1 cell surface. A) Flow cytometric detection of CD9 (mAb VJ1/20), $\beta 2$ (mAb TS1/18), αL (mAb TP1/40), αM (mAb Bear-1), αX (mAb HC1/1) and CD147 (mAb VJ1/9) proteins on the surface of THP-1 monocytic cells or THP-1/PMA macrophage-like cells. Gray filled histograms correspond to negative controls; empty histograms correspond to the expression of the indicated molecules. The numbers in boxes represent M.F.I. values. B) and C) confocal microscopy of THP-1, THP-1 in the presence of 0.4 mM Mn^{2+} and THP-1/PMA differentiated cells showing in panel B co-localization of CD9 (green) and $\beta 2$ (red) and in panel C co-localization of CD9 (green) and αL (red) at the cell surface. Representative images of confocal sections for each channel (green and red) and merged channels are shown together with co-localization histograms (right panels) showing Pearson co-localization values. Scale bars = 5 μm .



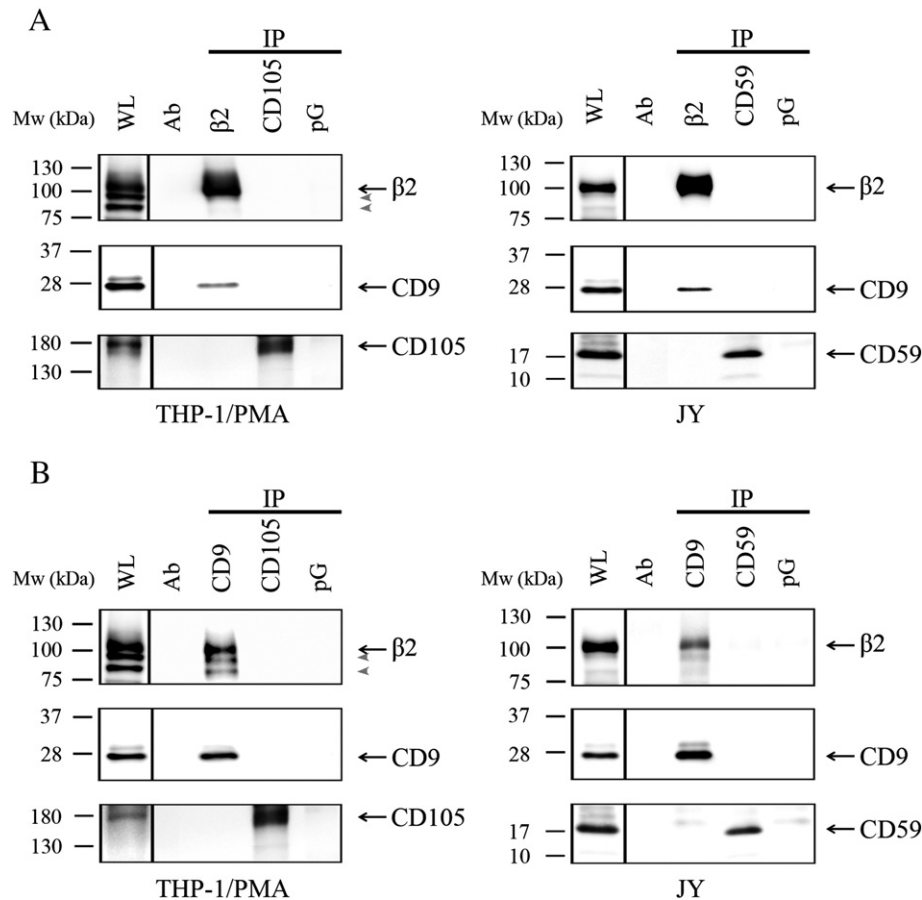


Fig. 2. Co-immunoprecipitation analysis of the association between LFA-1 and CD9. THP-1/PMA (left panels) and JY (right panels) cells were incubated with the immunoprecipitating mAbs TS1/18 (anti-β2) in panel A, and VJ1/20 (anti-CD9) in panel B, prior to their lysis in 1% Brij-97-containing lysis buffer. Protein immunocomplexes were precipitated with protein-G-sepharose, then resolved by 8% (for detection of β2) or 12% (for detection of CD9) SDS-PAGE under non-reducing conditions, and immunoblotted with anti-β2 (MEM-48) (upper panels) or anti-CD9 (VJ1/20) (middle panels) biotin-conjugated mAbs or with anti-CD105 or anti-CD59 control proteins (lower panels). Blots are representative of three different experiments. In some cell lysates, several β2 bands (indicated by gray arrowheads), probably corresponding to differences in glycosylation or partial degradation, are immunodetected. WL: whole cell lysate, pG: protein-G-sepharose without precipitating antibody.

3. Results

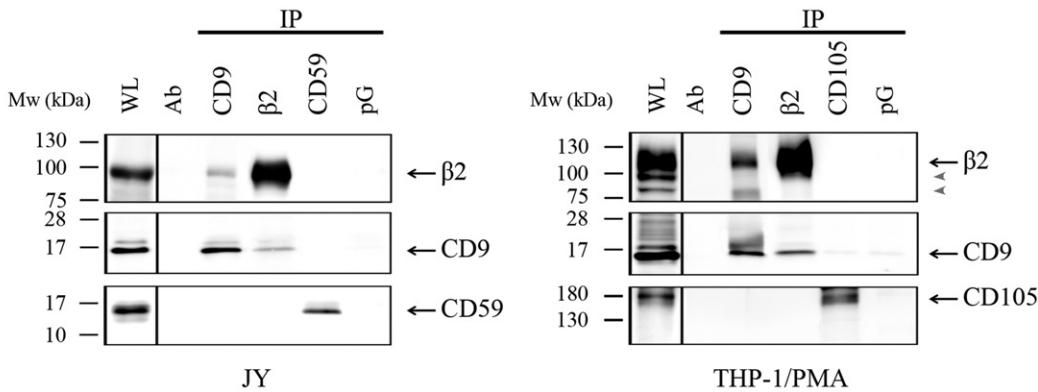
3.1. CD9 associates with β2 integrin on the leukocyte surface

To investigate the possible association between CD9 and the β2 integrin LFA-1, we first studied the co-localization of these molecules by double immunofluorescence staining with specific mAbs and confocal microscopy analysis. We employed monocytic THP-1 cells because they constitutively display detectable surface expression of the three

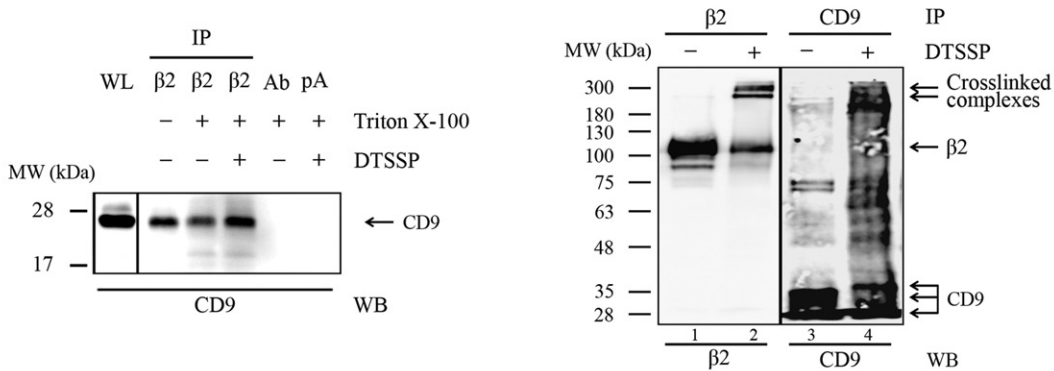
major β2 integrins ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$) and CD9 (Fig. 1A, upper histograms). Confirming previous reports, we observed that the surface expression of both CD9 [32,50] and β2 integrins [1] was increased during PMA-induced differentiation of THP-1 cells into macrophage-like cells (Fig. 1A, lower histograms). As shown in Fig. 1B, CD9 and β2 integrin subunit were found to co-localize partially on the surface of undifferentiated monocytic THP-1 cells and this co-localization became much more evident on PMA-differentiated macrophage-like THP-1 (THP-1/PMA) cells, particularly at the cell–cell contact regions in the

Fig. 3. Direct interaction of CD9 and LFA-1 at the cell surface is mediated by the Large Extracellular Loop of CD9. A) THP-1/PMA or JY cells were lysed with 1% Triton-X100-based lysis buffer after incubation with immunoprecipitating mAbs TS1/18 (anti-β2) or VJ1/20 (anti-CD9). Immunoblotting of co-immunoprecipitated proteins was performed as described in Materials and methods. WL: whole cell lysate, pG: protein-G-sepharose without precipitating antibody. B) 1% Brij-97 extracts of JY cells were treated with DTSSP cross-linker and Triton X-100 was then added to a final concentration of 1% (v/v) to cross-linked lysates and to parallel non-cross-linked lysates used as controls, as indicated. Samples were immunoprecipitated with anti-β2 integrin mAb TS1/18 (as indicated in the left panel and lanes 1 and 2 in the right panel) or with anti-CD9 mAb VJ1/20 (lanes 3 and 4 in the right panel), resolved by SDS-PAGE either under reducing conditions to break the thiol bond in DTSSP-crosslinked protein complexes (left panel) or under non-reducing conditions (right panel) and subsequently immunodetected with biotinylated anti-CD9 (VJ1/20) or anti-β2 integrin (MEM-48) mAbs. C) *In situ* proximity ligation assays (PLAs) were performed on THP-1/PMA macrophage-like cells as described in Materials and methods. Red fluorescent dots reveal molecular interactions between CD9 and β2 or αL integrin subunits of LFA-1. The interactions between CD147/CD9 and CD81/CD9 are also shown as negative and positive controls, respectively (left panels). Maximal projections of representative confocal stacks are shown. Scale bars = 5 μm. The right panel shows the quantitation of total fluorescence per cell. ***p < 0.001. D) Non biotinylated (left panel) or surface-biotinylated (right panel) JY cells were lysed in Triton-X100-based buffer and incubated with the LEL-GST constructs of human CD81 or CD9, as indicated. The GST and CD63–LEL–GST constructs were used as negative controls for specificity of binding. Formed complexes were pulled-down with glutathione-sepharose beads. For non-biotinylated cells, the presence of β2 integrin in the pulled-down complexes was revealed by immunoblotting with mAb MEM-48 (upper left-panel) and loading controls of GST fusion proteins stained with anti-GST polyclonal antibody are also shown (lower left-panel). For surface-biotinylated cells, all lysate proteins pulled-down by GST, CD63–LEL–GST or by CD9–LEL–GST were isolated with glutathione-sepharose beads and detected with streptavidin-HRP. As a control, β2 integrin was also immunoprecipitated with mAb TS1/18 from 1% Triton-X100 lysates of either surface-biotinylated or non-biotinylated (NB) JY cells and detected with streptavidin-HRP (which also clearly reveals the accompanying biotinylated 185 kDa band corresponding to the αL subunit of LFA-1) or by immunodetection with anti-β2 mAb MEM48, respectively.

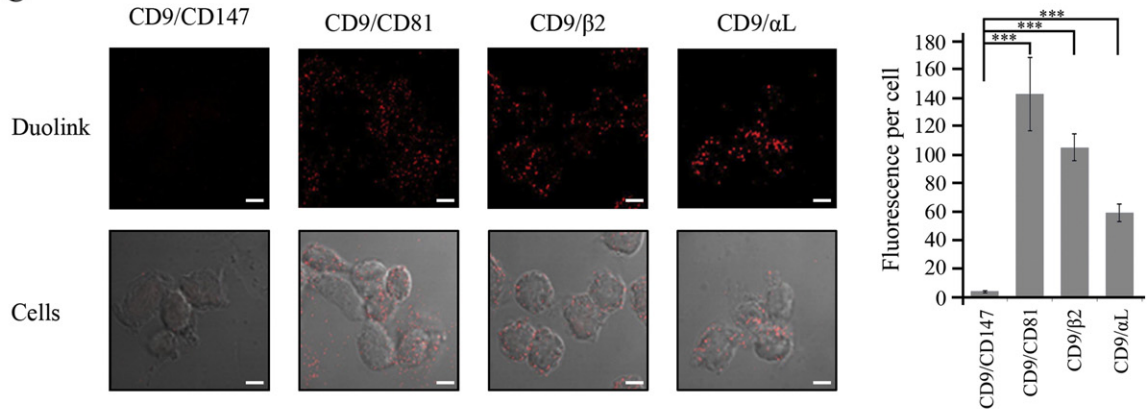
A



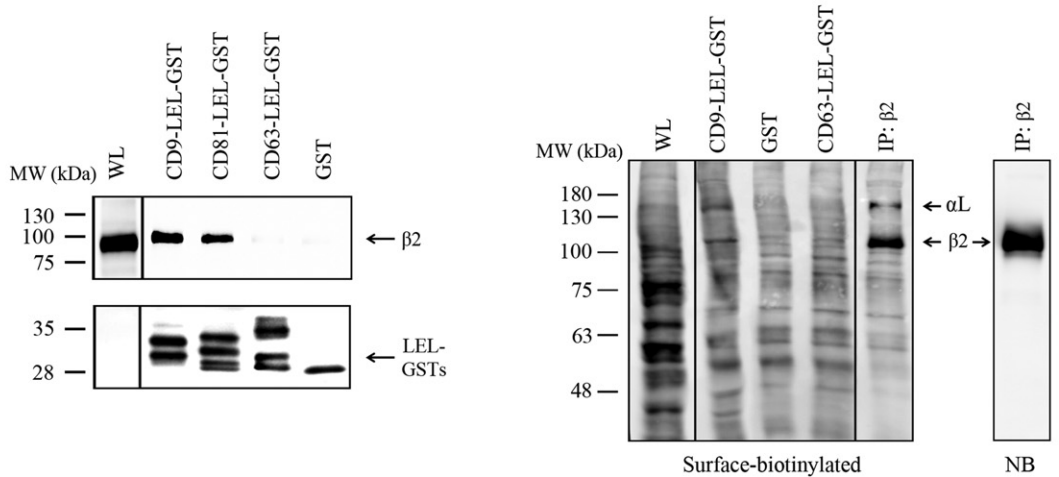
B



C



D



cellular aggregates that form during this differentiation process, as indicated by the increase in the Pearson co-localization coefficient. As we reported previously [55], when activation of $\beta 2$ integrin was induced with extracellular divalent cation Mn^{2+} the localization of $\beta 2$ integrin molecules changed from an evenly-distributed pattern to a patched/clustered distribution and interestingly CD9 was clearly found co-localizing with clustered $\beta 2$ integrin. Since the $\beta 2$ -specific mAb stained all the $\beta 2$ -containing integrins we also performed double immunofluorescence using an αL -specific mAb, confirming the pattern of co-localization between CD9 and LFA-1 (Fig. 1C). The specificity of the co-localization between CD9 and LFA-1 was evidenced by the almost complete lack of co-localization observed between CD9 and CD147 (Supplementary Fig. 1), which is another abundantly expressed surface protein on these cells (Fig. 1A).

Similar co-localization results were also observed in other leukocytes, including the B lymphoblastic JY and T leukemic Jurkat cells, which only express LFA-1, but not $\alpha M\beta 2$ or $\alpha X\beta 2$ (Supplementary Fig. 2), and collectively suggest that CD9 associates with $\beta 2$ -integrins, and particularly with LFA-1 ($\alpha L\beta 2$), on the surface of different types of leukocytic cells.

To confirm the association of CD9 with LFA-1, co-immunoprecipitation experiments were performed using JY and THP-1/PMA cells. All immunoprecipitations were performed using intact cells that were incubated with the immunoprecipitating mAbs at 37 °C prior to their lysis, thus ensuring that only interactions between cell surface molecules were detected. Immunoprecipitation using the $\beta 2$ -specific mAb TS1/18, from Brij-97 lysates of THP-1/PMA and JY cells, followed by immunoblotting with anti-CD9 mAb VJ1/20 clearly showed that this tetraspanin was co-precipitated with integrin LFA-1 (Fig. 2A). Co-immunoprecipitation was also detected in the reverse order, i.e. immunoprecipitating CD9 followed by immunodetection of $\beta 2$ integrin (Fig. 2B). Moreover, the association of LFA-1 with CD9 observed in Brij97-based lysates of THP-1/PMA and JY cells persisted under more stringent solubilization conditions such as the use of detergent Triton-X100 (1.0 %) (Fig. 3A), thus pointing to a strong/direct type of interaction taking place between these molecules on the leukocyte surface. Similar results were also obtained using Triton-X100 (1.0 %) lysates of Jurkat cells (not shown). Parallel immunoprecipitations were also carried out with cells incubated with immunoprecipitating antibodies at 4 °C and subsequently lysed in Triton-X100, to rule out that the observed association between CD9 and $\beta 2$ integrin is caused by pre-incubation with antibodies at 37 °C (Supplementary Fig. 3), and also with cells lysed at 4 °C with this detergent prior to the addition of precipitating antibodies, yielding essentially the same results (data not shown).

When chemical crosslinking of solubilized proteins from JY cells was performed with thiol-cleavable DTSSP an important increase in the amount of CD9 co-immunoprecipitated with $\beta 2$ integrin could be detected after cleavage of the cross-linked protein complexes in reducing conditions (Fig. 3B, left panel). Essentially the same results were also obtained with THP-1/PMA cells (data not shown). Furthermore, immunoprecipitation with anti- $\beta 2$ and anti-CD9 mAbs of non-cleaved cross-linked protein complexes resolved under non-reducing conditions clearly showed high molecular weight complexes of around 300 kDa which were immunodetected both with anti- $\beta 2$ and anti-CD9 antibodies (Fig. 3B, right panel), indicating that these molecules had been directly cross-linked. It is worth indicating that these ~300 kDa bands are compatible with covalently cross-linked complexes containing both LFA-1 subunits (αL = 185 kDa; $\beta 2$ = 95 kDa) plus a molecule of CD9 (24 kDa). Definitive proof that these ~300 kDa bands correspond to complexes including CD9 and $\beta 2$ integrin, was provided by the fact that they were immunoprecipitated both with anti- $\beta 2$ and anti-CD9 antibodies, and immunodetected in both cases with an anti- $\beta 2$ antibody (MEM-48) (Supplementary Fig. 4). Taken together, these crosslinking experiments support a direct-type of interactions occurring between endogenous LFA-1 and CD9 in leukocytic cells.

Further support for the direct nature of CD9–LFA-1 interaction on the leukocyte surface was provided by *in situ* Proximity Ligation Assays (PLAs) on non-permeabilized THP1/PMA cells. PLA signal is only detected when the secondary probes directed against the two different molecules whose interaction is suspected are within a short range distance (<40 nm) compatible with direct or closely proximal molecular interactions. As shown in Fig. 3C, PLA signal between CD9 and both subunits of LFA-1 (αL and $\beta 2$) was clearly revealed on the surface of THP-1/PMA cells, being the PLA signal particularly evident at cell–cell contact regions. The same procedure with the abundantly expressed membrane molecule CD147/EMMPRIN (Fig. 1A) did not provide any detectable PLA signal, revealing the specificity of PLA signal. As a positive control for primary/direct interactions, we assayed the association of CD9 with CD81, as these two tetraspanins are known to interact forming heterodimers and higher order oligomers on the cell surface [32,43,45].

Most reported lateral interactions of tetraspanins with other proteins, and particularly with integrins, occur through the variable region of their Large Extracellular Loop (LEL) domain [34,46,67]. To assess whether CD9–LFA-1 interaction is mediated through this domain, we carried out pull-down assays employing a GST-fusion protein corresponding to the LEL domain of CD9 (CD9–LEL–GST) [29,38]. The $\beta 2$ subunit of endogenous LFA-1 was pulled down by CD9–LEL–GST from Brij-97 (not shown) and Triton-X100 (Fig. 3D, left panel) lysates of JY cells (and THP-1/PMA cells, not shown). As a positive control, another GST construct corresponding to the LEL domain of CD81, a tetraspanin closely related to CD9, also pulled-down the $\beta 2$ integrin subunit, as previously reported [69]. In contrast, the GST–LEL construct of another tetraspanin, CD63, (CD63–LEL–GST) did not pull-down the $\beta 2$ integrin subunit, reflecting the specificity of these LFA-1/tetraspanin interactions. Furthermore, the CD9–GST–LEL fusion protein selectively recovered both the $\beta 2$ and the αL subunits of LFA-1 from a lysate of biotin-labeled JY cells, indicating that on these cells LFA-1 is a major surface protein that is selectively engaged in specific interactions with the LEL domain of CD9 (Fig. 3D, right panel).

3.2. CD9 regulates the adhesive function of integrin LFA-1

We decided to explore whether CD9 could regulate the adhesive function of LFA-1. For this goal, we first assessed the effects of several CD9-specific mAbs (VJ1/20, PAINS-10 and PAINS-13), which exert an agonist-like action on CD9 [29,31,32,51], on LFA-1-mediated leukocyte adhesion. Treatment of THP-1/PMA cells with the three different anti-CD9 mAbs inhibited significantly their adhesion to immobilized ligand ICAM-1 (Fig. 4A, left panel). The LFA-1-dependence of this assay was confirmed by the nearly complete inhibition of adhesion with the blocking anti- $\beta 2$ mAb Lia3/2 and by the important stimulation of adhesion with the $\beta 2$ -activating mAb Kim185. Similar results were also obtained with B lymphoblastic JY cells, which do not express $\beta 1$ integrin (Fig. 4B).

In contrast to freshly isolated resting human lymphocytes, which express very little CD9 on their surface [5,70], PHA/IL-2-activated lymphocytes (“lymphoblasts”) express abundantly the integrin LFA-1 as well as variable (from donor to donor) though consistently detectable levels of CD9 on their surface, together with modest $\alpha M\beta 2$ and negligible $\alpha X\beta 2$ integrin expression (Fig. 4C). Using these primary human lymphoblasts in static adhesion assays on ligand ICAM-1, we observed essentially the same regulatory effects of CD9-specific mAbs on the adhesive activity of LFA-1 (Fig. 4D), indicating that CD9 exerts inhibitory effects on LFA-1-mediated adhesion.

Interaction of integrin LFA-1 with specific ligands is a crucial step in many leukocyte intercellular interactions and particularly in the cytotoxic lymphocyte-mediated killing of target cells [2,11,24,25,40]. Interestingly, the observed inhibitory effect exerted by anti-CD9 mAbs (VJ1/20, PAINS-10 and PAINS-13) on LFA-1 was also reflected in LAK (lymphokine-activated killer cells)-mediated killing of target Daudi

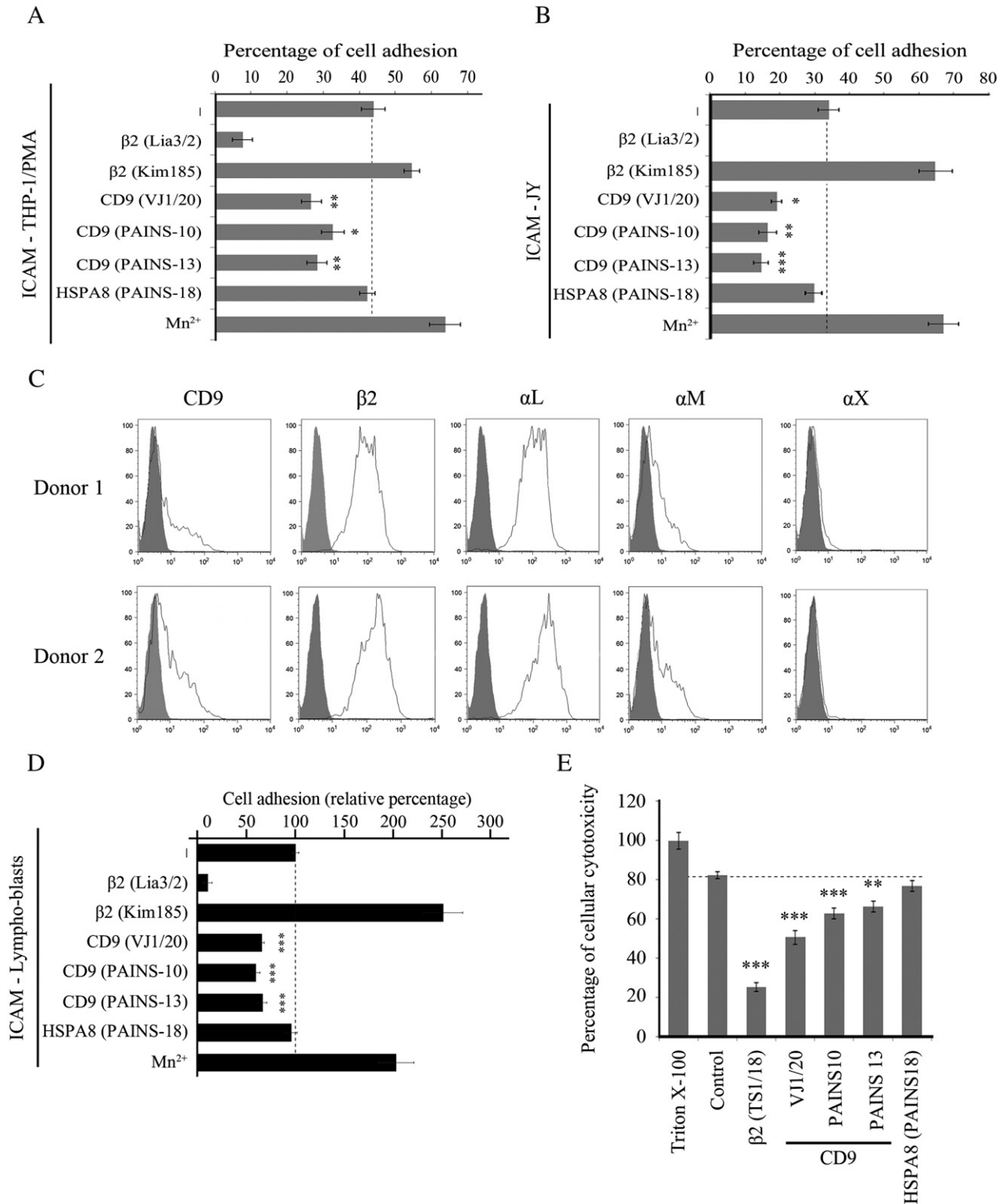


Fig. 4. Anti-CD9 mAbs inhibit LFA-1 adhesion and LAK cytotoxicity. A) THP-1/PMA cells were loaded with the fluorescent probe BCECF-AM (Sigma) and then allowed to adhere to ICAM-1-Fc-coated wells (6 μ g/ml) for 20 min at 37 °C in the presence of the indicated mAbs (20 μ g/ml). Data represent the percentage of adherent cells (mean \pm SEM of four experiments, each performed in triplicates) that remains in the wells after washing non-adherent cells. B) JY B lymphocytic cells, loaded with the fluorescent BCECF-AM probe, were seeded in 96-well plates pre-coated with ICAM-1-Fc (12 μ g/ml) and incubated for 20 min at 37 °C with the corresponding mAbs (20 μ g/ml) specified. The bars-graph represents the percentage of adhesion (mean \pm SEM) of 3 different experiments, performed in triplicates. C) Flow cytometric analysis of CD9 (mAb VJ1/20), $\beta 2$ (mAb TS1/18), αL (mAb TP1/40), αM (mAb Bear-1) and αX (mAb HC1/1) surface molecules on human T-lymphoblasts from two different donors. D) Adhesion of T-lymphoblasts to plastic-immobilized ICAM-1-Fc (6 μ g/ml). Cells were allowed to adhere for 20 min in the presence of the specified mAbs (20 μ g/ml). Data shown correspond to the percentages of adherent cells (mean \pm SEM of four experiments) relative to 100% cell adhesion (dotted line) considered in the absence of antibody treatment. E) LAK cytotoxic cells were pre-treated with control anti-HSPA8 mAb (PAINS-18), anti-CD9 antibodies (VJ1/20, PAINS-10 and PAINS-13) or the inhibitory anti- $\beta 2$ antibody TS1/18 and their cytotoxicity was analyzed by incubating them with Daudi target cells at a 10:1 (effector:target) ratio. Cytotoxicity was determined from the amount of LDH released to the medium. The data show the percentage of cytotoxicity (mean \pm SEM) of three different experiments performed in triplicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

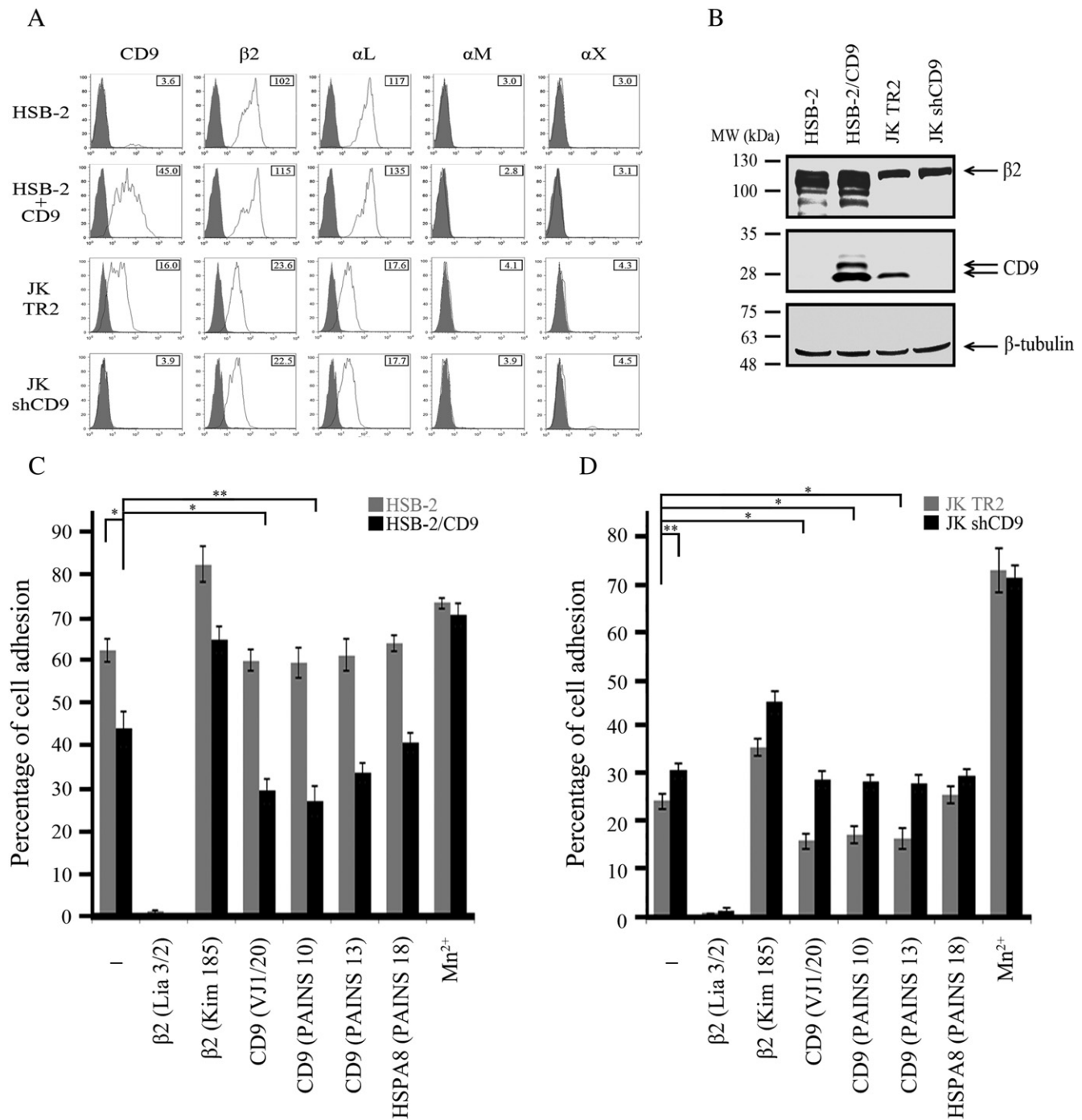
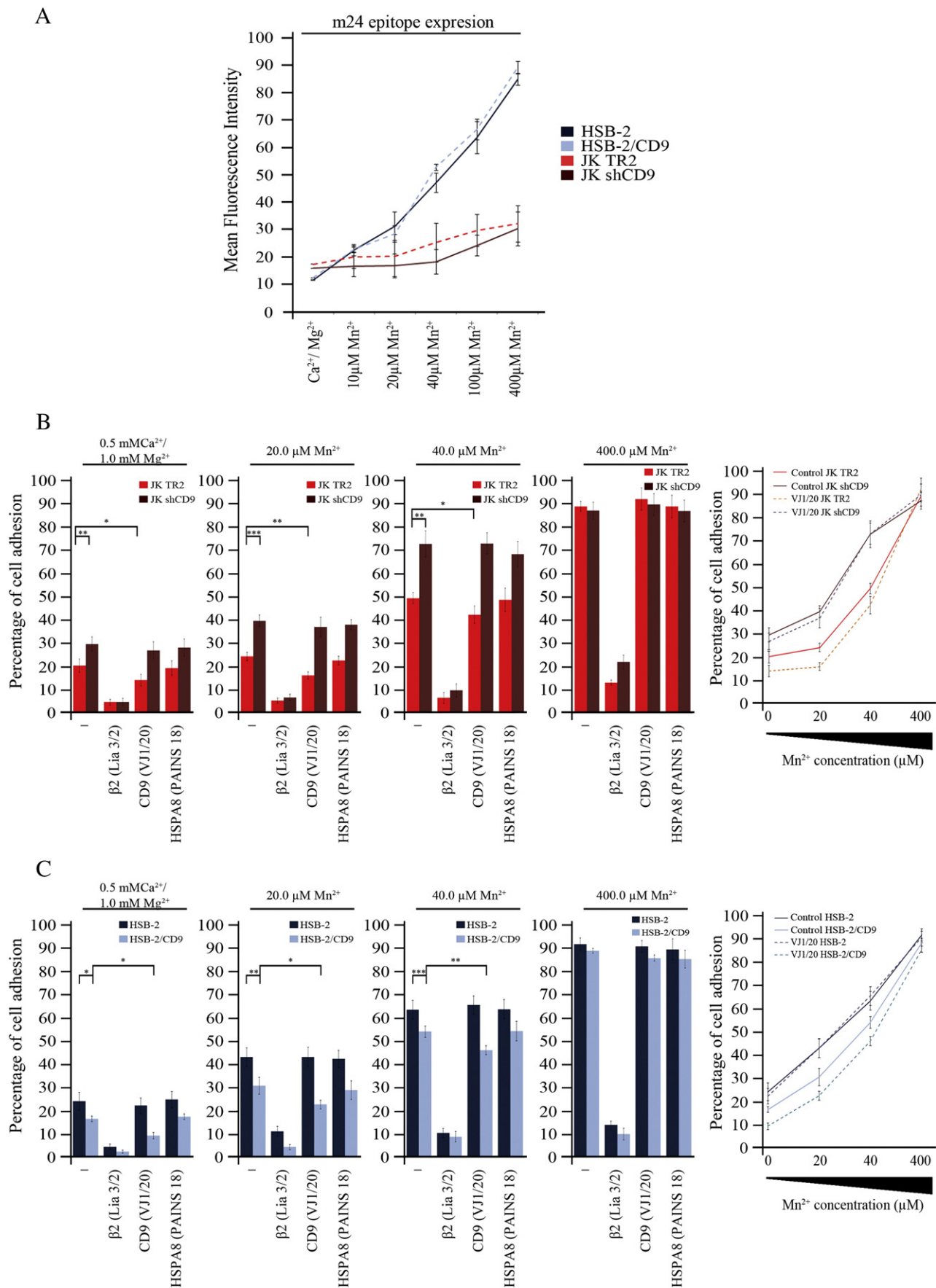


Fig. 5. Ectopic expression or silencing of CD9 regulates LFA-1 mediated adhesion. A) and B) ectopic neoexpression of CD9 in HSB-2 cells was achieved by stable transfection with the pcDNA3-CD9 (HSB-2/CD9) plasmid and CD9 knock-down in Jurkat cells was achieved by retroviral transduction with CD9-specific shRNA (JK shCD9). Jurkat cells transduced with an empty shRNA vector (JK TR2) were used as control. The neoexpression or silencing of CD9 in these cells was confirmed by flow cytometric analysis (A) and western blotting (B). C) After loading cells with BCECF-AM, HSB-2 (left panel) or Jurkat (right panel) cells were allowed to adhere for 60 min to immobilized ICAM-1-Fc (12 μg/ml), in the presence or absence of the indicated mAbs (20 μg/ml). The graphic shows the percentage of cell adhesion (mean ± SEM) of three independent experiments, each performed in triplicates. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01.

Fig. 6. CD9 regulation of LFA-1-mediated adhesion does not involve alteration of integrin affinity. A) Flow cytometric analysis of epitope m24 expression induced by Mn²⁺ (at 10, 20, 40, 100 and 400 μM) relative to its basal expression in Ca²⁺/Mg²⁺ (0.5 mM and 1 mM, respectively) on the surface of HSB-2 (dark blue solid line), HSB-2/CD9 (light blue dotted line), JK TR2 (red dotted line) and JK shCD9 (brown solid line) cells. B) and C) JK TR2 (red bars) and JK shCD9 (brown bars) (B) or HSB-2 (dark blue bars) and HSB-2/CD9 (light blue bars) (C) cells were loaded with BCECF-AM. Then cells were treated with different Mn²⁺ concentrations and allowed to adhere for 45 min to immobilized ICAM-1-Fc (12 μg/ml), in the presence or absence of the indicated mAbs (20 μg/ml). Each bar panel shows the percentages of adherent cells (mean ± SEM of three experiments) for each Mn²⁺ concentration, and data corresponding to these different Mn²⁺ concentrations are plotted in the right panel. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001.



cells (Fig. 4E). The allosterically inhibiting anti-CD18 mAb TS1/18 [57] was used as a blocking control. Taken together, these results confirm that mAbs with agonist-like effect on CD9 regulate negatively the adhesive function of LFA-1.

We next wanted to address whether changes in the expression levels of CD9 could also regulate LFA-1 adhesiveness, either by ectopically expressing this tetraspanin in the CD9-deficient HSB-2 T lymphoblastic cell line or, conversely, by suppressing CD9 expression using shRNA interference in Jurkat T cells (Fig. 5A and B). Ectopic expression of CD9 in HSB-2 cells reduced significantly LFA-1-mediated adhesion to immobilized ligand ICAM-1 (Fig. 5C), whereas silencing CD9 in Jurkat cells enhanced LFA-1-mediated adhesion to ICAM-1 (Fig. 5D). Interestingly, incubation of HSB-2/CD9 and Jurkat T cells with the anti-CD9 mAbs VJ1/20, PAINS-10 and PAINS-13, further reduced LFA-1-mediated adhesion to ICAM-1, confirming the agonist-like effect of these mAbs on CD9 function.

3.3. CD9-mediated regulation of LFA-1 adhesion does not involve changes in integrin affinity but alters its clustering

Integrin adhesive capacity is mainly regulated by two different mechanisms involving either, alterations in the conformation of individual integrin molecules that are reflected by affinity changes, or modifications in the aggregation of integrin molecules which affect the valency of their interactions with ligand. To investigate which of these mechanisms is involved in the observed CD9-mediated inhibition of LFA-1 adhesive function, we first analyzed the induction of expression of the m24 epitope by divalent cation Mn^{2+} , which reports the high affinity conformation of LFA-1. As shown in Fig. 6A, expression of m24 epitope was similarly induced by Mn^{2+} (over the 10–400 μM concentration range) on cells expressing CD9 (HSB-2/CD9 and JK TR2 cells) and on their respective counterparts lacking CD9 (HSB-2 and JK shCD9), clearly indicating that the presence of this tetraspanin does not interfere with the affinity state of LFA-1. As expected, Mn^{2+} induced LFA-1-mediated adhesion of JK (Fig. 6B) and HSB-2 (Fig. 6C) T cells in a concentration-dependent manner over a 20–400 μM range. Interestingly, the differences in static cell adhesion between cells lacking CD9 and their CD9-expressing counterparts disappeared at the highest (400 μM) Mn^{2+} concentration. The inhibitory effect of anti-CD9 mAb VJ1/20 was also abrogated at 400 μM Mn^{2+} . These results show that CD9 does not affect LFA-1 adhesive function when cell adhesion is mediated by integrin molecules in the high affinity state (i.e. at high Mn^{2+} concentration).

However, when T cell adhesion was promoted with phorbol ester PMA (at 50 and 200 ng/ml), which induces the intermediate affinity state of LFA-1 as well as ligand-dependent clustering of this integrin, CD9-caused inhibition of static adhesion was clearly observed even at the highest PMA dose (200 ng/ml) (Fig. 7A and B), suggesting that CD9 effect was somehow related to the aggregation/clustering of LFA-1. It is worth indicating that these CD9-caused inhibitory effects on adhesion are still maintained at higher concentrations of PMA (400 ng/ml) (data not shown), although cell viability under these conditions begins to be compromised. Importantly, these differences in PMA-induced LFA-mediated cell adhesion to ICAM-1 between T cells expressing or lacking CD9 were also consistently observed under flow conditions, therefore highlighting the relevance of CD9-mediated regulation of LFA-1 function under conditions that resemble a more physiological setting (Fig. 7C).

To analyze in more detail the implication of CD9 in the organization of LFA-1 molecules, we first quantitated the number and size of LFA-1 clusters on the adhesive surface of PMA-stimulated T cells either expressing (JK TR2) or lacking CD9 (JK shCD9). As shown in Fig. 8A (upper panel), the number of PMA-induced LFA-1 clusters detected by confocal microscopy on the cellular adhesive surface in contact with immobilized ligand ICAM-1 was significantly higher on Jurkat T cells expressing CD9 than on their CD9-silenced counterparts. Interestingly, although fewer LFA-1 clusters were observed on cells lacking CD9 expression, their size was bigger than on CD9-expressing cells. Likewise, the presence of CD9 induced the organization of LFA-1 molecules into an increased number of smaller clusters in PMA-stimulated monocytic U937 cells adhering onto ICAM-1 (Fig. 8A, lower panel). These results were corroborated by TIRF microscopy, which recognizes with high resolution and high signal-to-noise ratio the organization of cell surface molecules located specifically in the area of contact with the substrate (ICAM-1). Quantitation of fluorescence from TIRF microscopy images shows that CD9-expressing T cells (JK TR2) display an increased number of clusters but of a smaller size as well as a significant proportion of LFA-1 molecules with a dispersed/unclustered appearance, compared to their CD9-lacking (JK shCD9) cell counterparts (Fig. 8B).

As a complementary biochemical approach to get further insight on how CD9 affects the organization of LFA-1 molecules on the leukocyte surface, the differential resistance of LFA-1 molecules to extraction with increasing concentrations of detergent Triton X-100 (ranging from 0.02 to 1%) in Jurkat cells expressing (JK TR2) or lacking CD9 (JK shCD9) was analyzed. As shown in Fig. 8C, LFA-1 molecules were much more easily extracted when CD9 is expressed on the cell surface, as would be expected from the increased proportion of LFA-1 found in a dispersed/unclustered form and organized in smaller clusters.

Collectively, the confocal and TIRF microscopy data together with the biochemical extraction results show that CD9 affects the organization of LFA-1 molecules into clusters, as evidenced by the differences in the number and size of LFA-1 aggregates on the cell surface as well as by their resistance to detergent extraction.

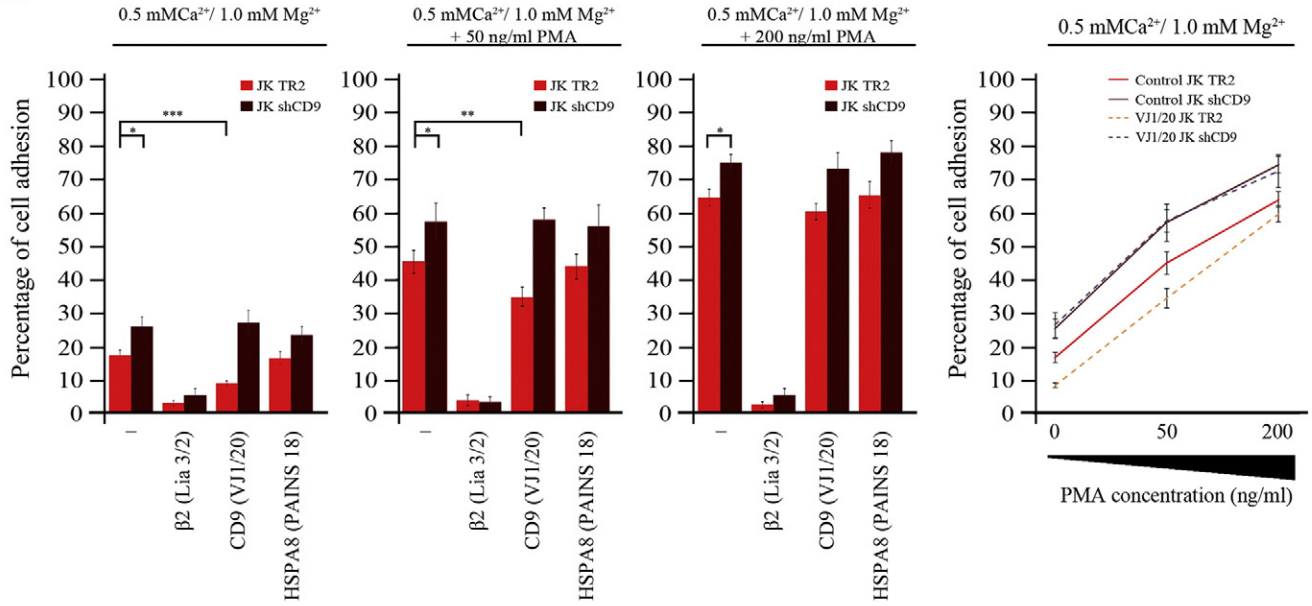
4. Discussion

We report here that the $\beta 2$ integrin LFA-1 associates with CD9 in different types of leukocytes, including T (Jurkat) and B (JY) lymphocytic cell lines, and PMA-differentiated THP-1 macrophage-like cells.

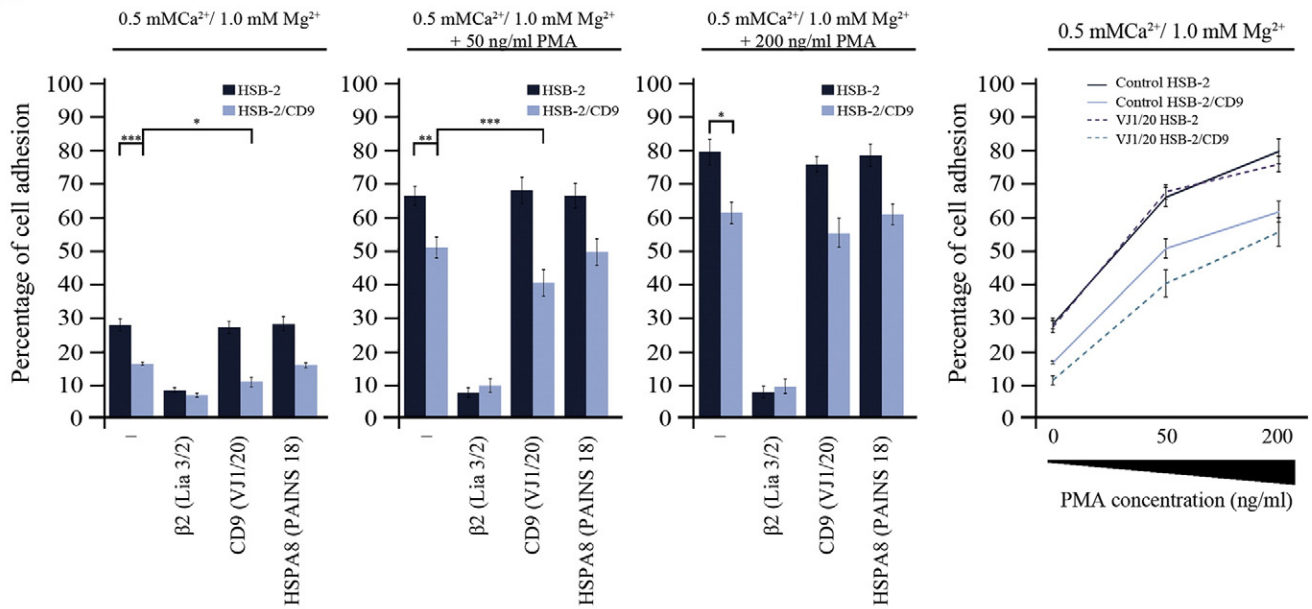
The CD9/LFA-1 association was evidenced by co-localization, *in situ* Proximity Ligation Assays (PLA), as well as biochemical studies based on co-immunoprecipitation, chemical cross-linking and pull-down assays. These interactions resist stringent cell solubilization conditions (i.e. 1% Triton X-100) in co-immunoprecipitation and pull-down experiments which, together with chemical cross-linking and PLA data, collectively support the direct nature of the interaction between CD9 and LFA-1. Both co-localization and PLA signal were particularly evident at the cell–cell contact regions of THP-1 cell aggregates formed during their PMA-induced differentiation process, which are areas enriched in LFA-1 molecules actively engaged in interactions with ICAM-1 ligand expressed on opposing cells, suggesting that the association of CD9 with LFA-1 might be important in the regulation of LFA-1 adhesive function. Tetraspanin–integrin interactions seem to be consistently mediated through the variable region of the LEL domain of tetraspanins [8,20,35,79]; in this regard our pull-down experiments with a recombinant construct corresponding to the CD9 LEL-domain indicate that the

Fig. 7. CD9 regulates PMA-induced LFA-1 adhesion through an increment in integrin clustering. A) and B) prior to adhesion, JK TR2 and JK shCD9 (red and brown bars, respectively) (A) or HSB-2 and HSB-2/CD9 (dark and light blue bars, respectively) (B) cells were treated 2 h at 37 °C with different concentrations of PMA (0, 50 or 200 ng/ml). Then cells were loaded with the fluorescent probe BCECF-AM and allowed to adhere to plastic-immobilized ICAM-1-Fc (12 $\mu g/ml$) for 45 min at 37 °C in the presence or absence of the indicated mAbs (20 $\mu g/ml$). Data represent the percentages of adherent cells (mean \pm SEM of three experiments), and data corresponding to these different PMA concentrations are plotted in the right panel. C) Adhesion of PMA-stimulated JK TR2 and JK shCD9 cells to ICAM-1 under shear flow conditions. Left panel contains a representative image showing the cells that remain adhered for each different flow rate, and the right panel graph shows the calculated ratios of adherent cells from 9 different microscopic fields for each flow rate condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Scale bars = 30 μm .

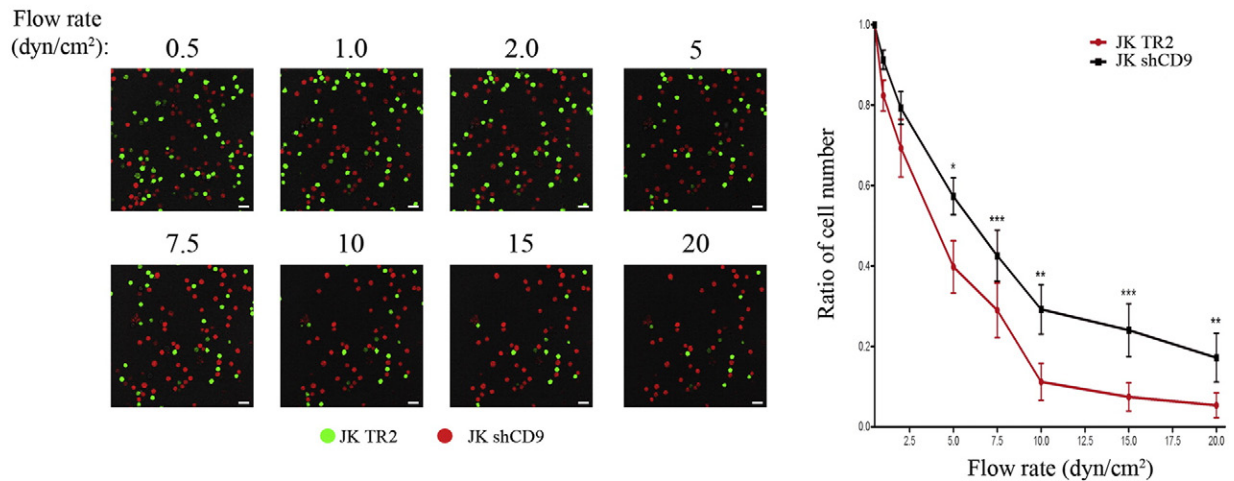
A



B



C



interaction between $\beta 2$ integrin and CD9 is also mediated by this domain.

After demonstrating the existence of CD9–LFA-1 complexes in different types of leukocytes we next explored whether CD9 exerted any functional effects on the adhesive capacity of LFA-1. For this purpose, we have made use of three different anti-CD9 mAbs (VJ1/20, PAINS-10 and PAINS-13) considered to exert, at the cellular level, an agonist-like action on the basis that in different cellular systems the functional effects caused by treating CD9⁺ cells with these antibodies are similar to those derived from the neo- or over-expression of CD9, but opposite to those observed after silencing this tetraspanin [29,32,51]. The use of these three anti-CD9 mAbs, as well as ectopic expression of CD9 in HSB-2 T cells or silencing the endogenous CD9 expression in Jurkat T cells using specific shRNAs, collectively show that CD9 exerts a negative regulatory role on LFA-1-mediated leukocyte adhesion. Consistently with the CD9 inhibitory effect on adhesion, LAK-cellular cytotoxicity against target cells, which is largely dependent on LFA-1-mediated intercellular adhesion, was also inhibited by these anti-CD9 mAbs. Engagement of tetraspanins CD81 or CD82 with specific mAbs or overexpression of these molecules on T cells has been reported to up-regulate the adhesive and signaling capacities of the integrin LFA-1 [62,75], whereas for the tetraspanin CD9 we report here the opposite: a clear inhibitory effect on LFA-1-mediated cellular adhesion and *in vitro* cellular cytotoxicity. One possibility is that the different functional effects of distinct tetraspanins on LFA-1 adhesive function might depend on the specific cellular system under study or the specific ligand employed (ICAM-3 employed in some of these previous reports versus ICAM-1 employed here), or alternatively CD9 may exert specific functional effects on LFA-1.

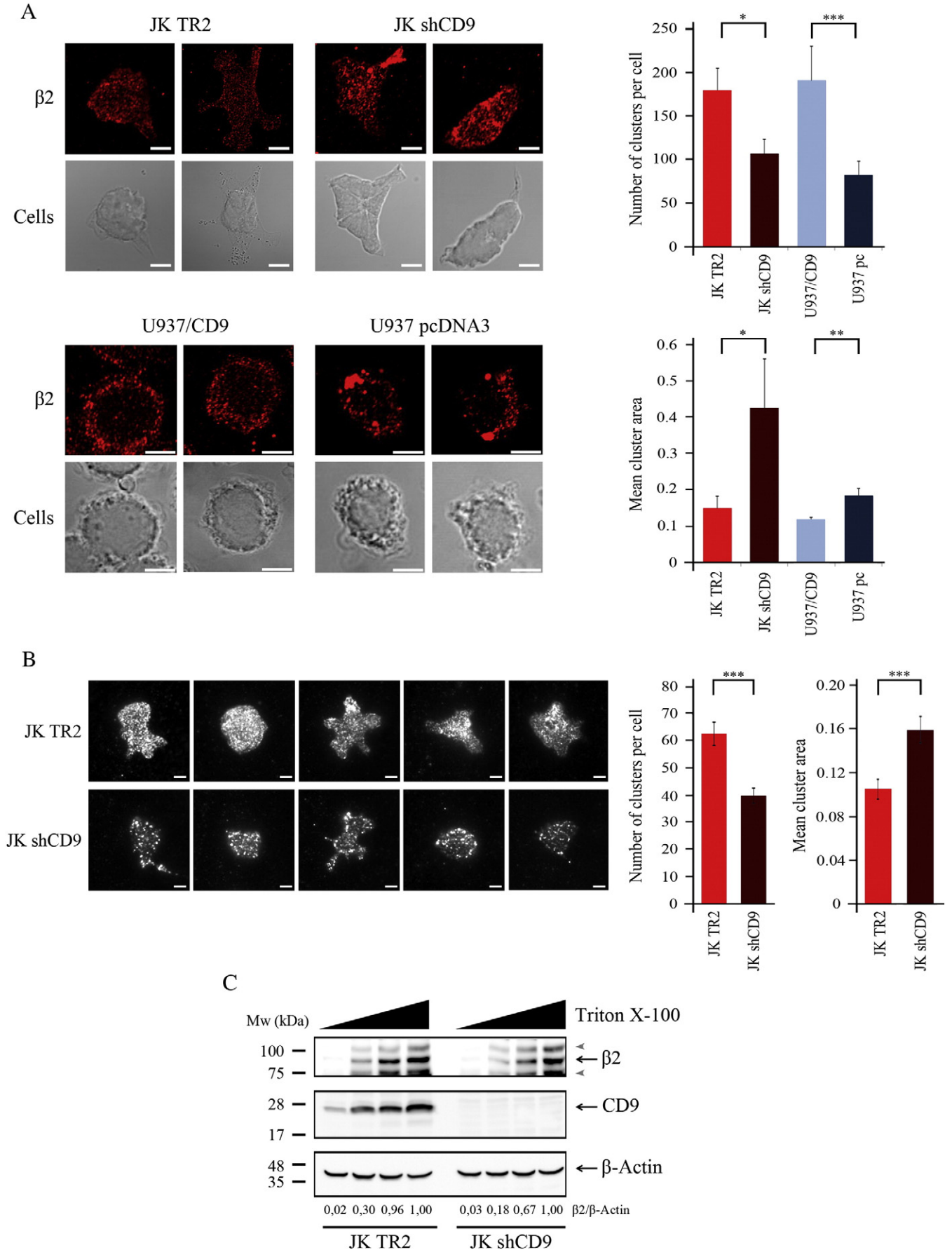
Integrin adhesive capacity can be regulated essentially by mechanisms involving either alterations in the affinity of individual integrin molecules or changes in their aggregation/clustering on the cell surface which regulate the valency of their interactions with ligand. As reported by the expression of the m24 epitope, the high affinity conformation of LFA-1 induced by Mn^{2+} was not altered by ectopic expression or silencing of CD9; accordingly, no differences were observed in LFA-1-mediated adhesion stimulated by 400 μM Mn^{2+} between cells expressing or lacking CD9. In contrast, it is interesting that at lower Mn^{2+} concentrations (20 and 40 μM), at which presumably only a proportion of total LFA-1 molecules are in the high affinity conformation, differences in adhesion between cells expressing or lacking CD9 could be observed. Moreover, the differences between cells expressing and lacking CD9 were also consistently observed when cell adhesion was promoted with PMA, which induces the intermediate affinity state of LFA-1 as well as ligand-dependent clustering of this integrin. All these results clearly indicated that the effect of CD9 on LFA-1-mediated adhesion was mainly related to the aggregation/clustering state of this integrin and not to changes in its affinity. Indeed, confocal and TIRF microscopy analyses of PMA-induced LFA-1 clustering specifically at the adhesive cellular surface in contact with immobilized ligand ICAM-1 showed that in leukocytic cells expressing CD9 an increased number of clusters but with a smaller size could be detected in comparison with their CD9-lacking cell counterparts. TIRF microscopy images also revealed that in T cells expressing CD9 a significant proportion of LFA-1 molecules showed a dispersed/unclustered appearance, which might correspond to the nanoclusters of LFA-1 that have been characterized by other higher resolution microscopy techniques. In this regard, through the use of NSOM (near-field scanning optical microscopy) and SDT (single

dye tracking) super-resolution optical techniques, it has been recently reported that LFA-1 is preorganized in nanoclusters in “hotspot” regions of the leukocyte membrane. Ligand binding favors the lateral mobility and growth of LFA-1 clusters through coalescence of individual nanoclusters to form microclusters, in a process that also critically depends on transient cytoskeleton anchorage, which in turn mediate efficient stable leukocyte adhesion under shear flow [3,74]. Our findings are therefore compatible with these observations, and we can speculate that CD9 might have an important role in regulating these transitions among the different states of LFA-1 organization into distinct types of differently-sized clusters as well as the anchorage to the actin cytoskeleton.

Interestingly, we have observed that the $\beta 1$ integrin-mediated adhesion of leukocytes to the extracellular matrix protein fibronectin was enhanced by anti-CD9 mAbs or following ectopic expression of this tetraspanin (data not shown), which concurs with our previous data with colorectal carcinoma cells [51]. Therefore, CD9 seems to have a dual functional regulatory role on leukocyte adhesion mechanisms by increasing $\beta 1$ adhesion to fibronectin but down-regulating LFA-1-mediated adhesion. Reciprocal control of the activity of members of distinct subfamilies of integrins co-expressed on the same cell has been previously described. For instance, in some leukemic T cell lines functionally active integrin $\alpha 4\beta 1$ occurs only when LFA-1 is either not expressed or inactive [73], whereas in human erythroleukemic K562 cells transfected with integrin $\alpha v\beta 3$, ligation of the $\beta 3$ integrin subunit inhibits the phagocytic function of endogenously expressed $\alpha 5\beta 1$ integrin [12,13]. Similarly, in human T lymphoblasts induction of activation of LFA-1 resulted in decreased adhesion through $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins, rendering cells with a less adhesive and more migratory phenotype [52]. However, the underlying mechanisms for this type of regulation are still unclear. Association with cytoskeleton is essential for integrin activation and adhesion. Interestingly, actin cytoskeleton seems to play a differential role in the control of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrin function. In this regard, in resting leukocytes LFA-1 molecules are maintained in an inactive low-avidity state through association with actin microfilaments and release from these cytoskeletal constraints, caused by drugs such as cytochalasin D or latrunculin B, increases their lateral diffusion which is accompanied by enhanced clustering and avidity and augmented LFA-1-mediated leukocyte adhesion to ICAM-expressing cells [44,71]. In contrast, most $\beta 1$ integrins (with the notable exception of $\alpha 4\beta 1$ interaction with VCAM-1) mediate a more stable type of cell adhesion to extracellular matrix proteins such as fibronectin, collagen and laminin, and for this purpose seem to require firmer links with cytoskeletal components [10,22,59]. Several tetraspanins, including CD81 and CD9, are linked to actin microfilaments through ERM (Ezrin–Radixin–Moesin) proteins, either directly or through tetraspanin-associated partners EWI-2 and EWI-F [56]. The fact that CD9 may modulate in an opposite manner the adhesive function of $\beta 2$ and $\beta 1$ integrins points to CD9-centered TEMs as crucial players in this balanced regulation. An attractive possibility is that, by reinforcing the integrin–cytoskeletal links, CD9 may restrict the membrane lateral diffusion of LFA-1 molecules resulting in inhibition of its adhesive function, while at the same time, stabilizing $\beta 1$ integrins with concomitant adhesion enhancement to matrix components. Further research will be required to properly address this attractive hypothesis.

The model depicted in Fig. 9 summarizes the main findings of this report. State “1” in the model is characterized by expression of dispersed

Fig. 8. CD9 regulates the distribution of LFA-1 molecules into clusters. A) Confocal microscopy images of immunofluorescence-stained $\beta 2$ integrin clustering at the adhesive surface in contact with ligand ICAM-1-Fc of PMA-stimulated JK TR2, JK shCD9, U937/pcDNA3 and U937/CD9 cells. Representative confocal images are shown on the left panels and quantitation of the number and size (mean area) of clusters/cell corresponding to ten individual cells are shown on the right panels. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Scale bars = 5 μm . B) TIRF microscopy images of $\beta 2$ integrin clustering at the adhesive surface in contact with ligand ICAM-1-Fc of PMA-stimulated JK TR2, JK shCD9. Five representative images are shown for each cell type on the left panel and quantitation of the number and size of clusters/cell corresponding to 15 individual cells are shown on the right panels. *** $p < 0.001$. Scale bars = 5 μm . C) Differential resistance of LFA-1 molecules to extraction with increasing concentrations of detergent Triton X-100 (0.02/0.05/0.1/0.5%) from PMA-stimulated Jurkat cells either expressing (JK TR2) or lacking CD9 (JK shCD9), adhered to ICAM-1-Fc. Extracted LFA-1 was detected by immunoblotting with the anti- $\beta 2$ mAb MEM48, and quantitated relative to β -actin content.



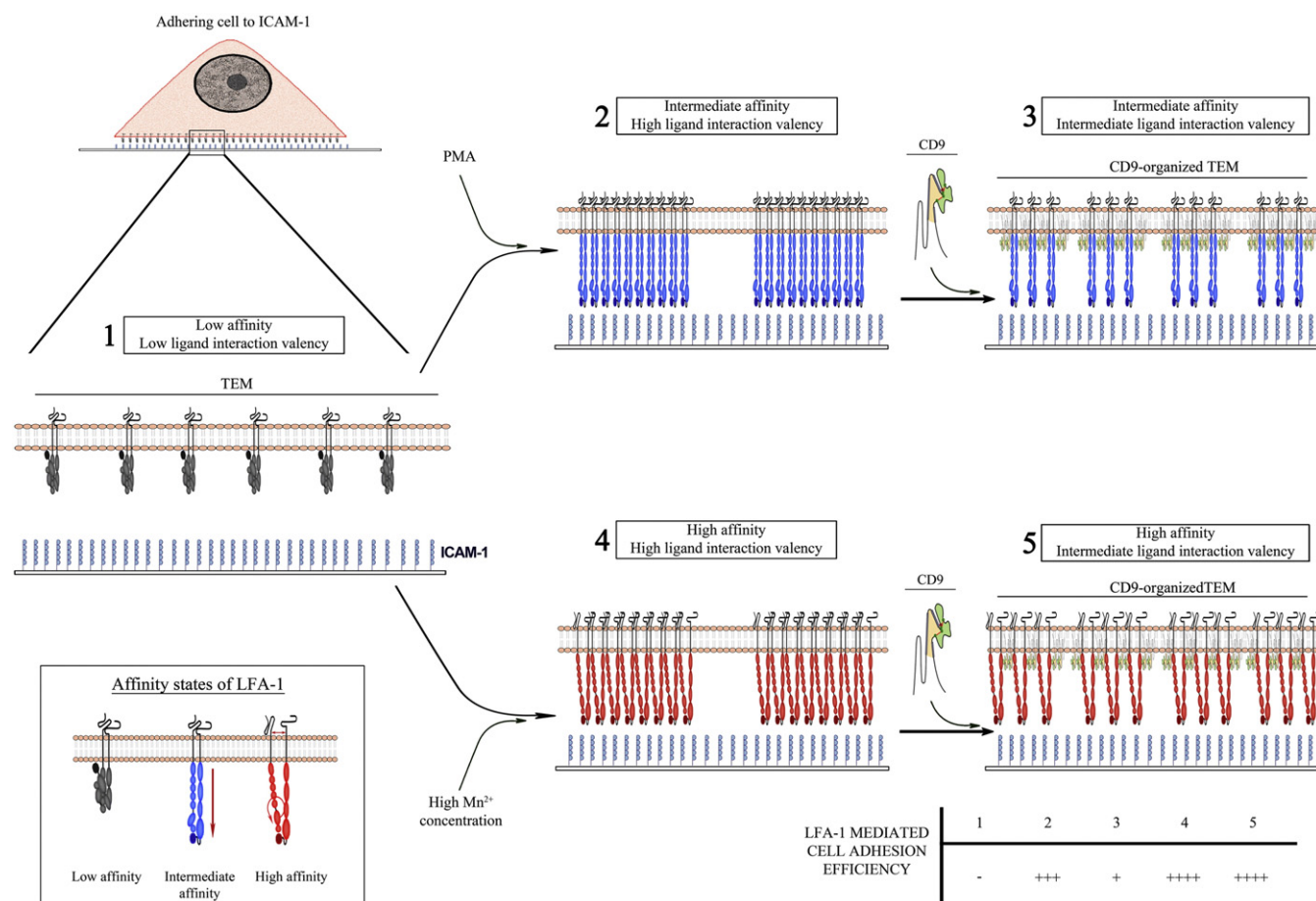


Fig. 9. Hypothetical model which summarizes the regulation by CD9 of the different LFA-1 functional states, as described in the Discussion.

and inactive/bent form of LFA-1 (Low-valency/Low-affinity) and by the absence/very low expression of CD9, as occurs physiologically in most resting/non-stimulated lymphocytes [5,70]. Conversion from state “1” into a High-valency/Intermediate-affinity state (“2”) is characterized by aggregation of integrin molecules into large clusters and the acquisition of intermediate affinity conformation, both induced by phorbol ester PMA. Within the context of TEMs, augmented CD9 function induced by its ectopic neoexpression (or by the use of agonist-like mAbs to this tetraspanin, not shown in the model), alters the organization of LFA-1 molecules at the cell adhesion surface, as evidenced by an increase in “dispersed” LFA-1 molecules and in the number of clusters with a reduced size, defining an Intermediate-valency/Intermediate-affinity state (“3”) characterized by diminished adhesive efficiency to ligand ICAM-1 relative to state “2”. On the other hand, state “4” is induced by high concentration of Mn^{2+} and is characterized by clustering of LFA-1 molecules in a high affinity conformation (High-valency/High-affinity state); in this case, transition from state “4” into “5”, caused by the ectopic expression of CD9 (or by the use of agonist-like mAbs to this tetraspanin, not shown in the model), is not accompanied by a down-modulation of the adhesive efficiency because, although probably some reduction in the ligand-interaction valency occurs, this effect is not potent enough to decrease cell adhesion when mediated by a majority of LFA-1 molecules in the high affinity conformation. The inhibitory effects on LFA-1-mediated cell adhesion (observed in transitions “2”→“3”) could place CD9 as a novel target for therapeutic intervention aimed at reducing the activity of LFA-1, which would be potentially beneficial in a number of inflammatory disorders.

5. Conclusions

Our data demonstrate that the tetraspanin CD9 associates with integrin LFA-1 in different types of leukocytes, and through these interactions, CD9 exerts inhibitory effects on LFA-1 adhesive function and leukocyte cytotoxic activity. The mechanism responsible for this negative modulation exerted by CD9 does not involve changes in the affinity state of LFA-1 but relates to alterations in its state of aggregation. These data contribute to our understanding of the regulation of adhesive activity of LFA-1, an integrin that plays a pivotal role in many crucial leukocyte functions that require intercellular adhesion.

Abbreviations

BSA	bovine serum albumin
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GST	glutathione S-transferase
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL-2	interleukin 2
INT	2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride
LDH	lactate dehydrogenase
LAK	lymphokine-activated killer
LEL	large extracellular loop
mAb	monoclonal antibody
M.F.I.	mean fluorescence intensity

PBLs	peripheral blood leukocytes
PBS	phosphate buffered saline
PLAs	proximity ligation assays
PMA	phorbol myristate acetate
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of the mean
TBS	tris buffered saline
TEM	tetraspanin-enriched microdomain
TIRF	total internal reflection fluorescence

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.018>.

Authors' contributions

RR carried out the confocal and TIRF microscopy, biochemical studies, flow cytometry, gene transfection, silencing and cell adhesion experiments. She also participated in the design of the study and performed the statistical analysis. AM performed confocal microscopy and some biochemical studies and adhesion experiments. She also participated in the design of the study. MYM carried out confocal and TIRF microscopy and biochemical experiments and participated in the interpretation of data and helped to draft the manuscript. BC performed some biochemical experiments. GM performed cell adhesion experiments. AG performed some adhesion experiments. YM participated in the flow cytometry and cell adhesion experiments. EL participated in the transfection, silencing and cell adhesion experiments and helped to draft the manuscript. PM participated in the pull-down experiments and in the interpretation of data. FSM participated in the conception and design and interpretation of data, and helped to draft the manuscript. CC conceived the study, and took responsibility for its design and coordination and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

This work was supported by grant SAF2012-34561 from the Spanish «Ministerio de Economía y Competitividad-MINECO», (to C.C.). R.R. salary has been supported by a «Profesor Ayudante» position from Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

References

- [1] P. Aller, C. Rius, F. Mata, A. Zorrilla, C. Cabanas, T. Bellon, C. Bernabeu, Camptothecin induces differentiation and stimulates the expression of differentiation-related genes in U-937 human promonocytic leukemia cells, *Cancer Res.* 52 (1992) 1245–1251.
- [2] N. Anikeeva, K. Somersalo, T.N. Sims, V.K. Thomas, M.L. Dustin, Y. Sykulev, Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 6437–6442.
- [3] G.J. Bakker, C. Eich, J.A. Torrenó-Pina, R. Diez-Ahedo, G. Perez-Samper, T.S. van Zanten, C.G. Figdor, A. Cambi, M.F. García-Parajo, Lateral mobility of individual integrin nanoclusters orchestrates the onset for leukocyte adhesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 4869–4874.
- [4] O. Barreiro, M. Yanez-Mo, M. Sala-Valdes, M.D. Gutierrez-Lopez, S. Ovalle, A. Higginbottom, P.N. Monk, C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation, *Blood* 105 (2005) 2852–2861.
- [5] S. Barrena, J. Almeida, M. Yunta, A. Lopez, N. Fernandez-Mosteirin, M. Giral, M. Romero, L. Perdiguer, M. Delgado, A. Orfao, et al., Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation, *Leukemia* 19 (2005) 1376–1383.
- [6] S. Bassani, L.A. Cingolani, Tetraspanins: interactions and interplay with integrins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 703–708.
- [7] F. Berditchevski, Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 4143–4151.
- [8] F. Berditchevski, E. Gilbert, M.R. Griffiths, S. Fitter, L. Ashman, S.J. Jenner, Analysis of the CD151- α 3 β 1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 41165–41174.
- [9] A.R. Berendt, A. McDowall, A.G. Craig, P.A. Bates, M.J. Sternberg, K. Marsh, C.I. Newbold, N. Hogg, The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site, *Cell* 68 (1992) 71–81.
- [10] A.L. Berrier, K.M. Yamada, Cell-matrix adhesion, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 565–573.
- [11] D. Blanchard, C. van Els, J. Borst, S. Carrel, A. Boylston, J.E. de Vries, H. Spits, The role of the T cell receptor, CD8, and LFA-1 in different stages of the cytolytic reaction mediated by alloreactive T lymphocyte clones, *J. Immunol.* 138 (1987) 2417–2421.
- [12] S.D. Blystone, I.L. Graham, F.P. Lindberg, E.J. Brown, Integrin α v β 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor α 5 β 1, *J. Cell Biol.* 127 (1994) 1129–1137.
- [13] S.D. Blystone, F.P. Lindberg, S.E. LaFlamme, E.J. Brown, Integrin β 3 cytoplasmic tail is necessary and sufficient for regulation of α 5 β 1 phagocytosis by α v β 3 and integrin-associated protein, *J. Cell Biol.* 130 (1995) 745–754.
- [14] C. Boucheix, J.Y. Perrot, M. Mirshahi, F. Giannoni, M. Billard, A. Bernadou, C. Rosenfeld, A new set of monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia, *Leuk. Res.* 9 (1985) 597–604.
- [15] C. Cabanas, M. Mittelbrunn, F. Sanchez-Madrid, Integrin α L, UCSD-Nature Molecule Pages 2008, <http://dx.doi.org/10.1038/mpa.001209.01>.
- [16] C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, A. Acevedo, T. Bellon, J.M. Fernandez, V. Larraga, C. Bernabeu, Characterization of a CD11c-reactive monoclonal antibody (HC1/1) obtained by immunizing with phorbol ester differentiated U937 cells, *Hybridoma* 7 (1988) 167–176.
- [17] M.R. Campanero, M.A. del Pozo, A.G. Arroyo, P. Sanchez-Mateos, T. Hernandez-Caselles, A. Craig, R. Pulido, F. Sanchez-Madrid, ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway, *J. Cell Biol.* 123 (1993) 1007–1016.
- [18] C.V. Carman, T.A. Springer, Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 547–556.
- [19] C. Cluzel, F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B.A. Imhof, B. Wehrle-Haller, The mechanisms and dynamics of $(\alpha$)v $(\beta$)3 integrin clustering in living cells, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 383–392.
- [20] S. Charrin, F. Le Naour, O. Silvie, P.E. Milhiet, C. Boucheix, E. Rubinstein, Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web, *Biochem. J.* 420 (2009) 133–154.
- [21] S. Charrin, F. Le Naour, M. Oualid, M. Billard, G. Faure, S.M. Hanash, C. Boucheix, E. Rubinstein, The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 14329–14337.
- [22] E.J. Chen, M.H. Shaffer, E.K. Williamson, Y. Huang, J.K. Burkhardt, Ezrin and moesin are required for efficient T cell adhesion and homing to lymphoid organs, *PLoS ONE* 8 (2013) e52368.
- [23] M.S. Chen, K.S. Tung, S.A. Coonrod, Y. Takahashi, D. Bigler, A. Chang, Y. Yamashita, P.W. Kincade, J.C. Herr, J.M. White, Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin α 6 β 1: implications for murine fertilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 11830–11835.
- [24] J.E. de Vries, H. Yssel, H. Spits, Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes, *Immunol. Rev.* 109 (1989) 119–141.
- [25] I. Dransfield, C. Cabanas, J. Barrett, N. Hogg, Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function, *J. Cell Biol.* 116 (1992) 1527–1535.
- [26] I. Dransfield, C. Cabanas, A. Craig, N. Hogg, Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1, *J. Cell Biol.* 116 (1992) 219–226.
- [27] M.L. Dustin, T.A. Springer, T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1, *Nature* 341 (1989) 619–624.
- [28] C.G. Gahmberg, L. Valmu, A. Kotovuori, P. Kotovuori, T.J. Hilden, S. Fagerholm, C. Kantor, T. Nurminen, E. Ihanus, L. Tian, Leukocyte adhesion—an integrated molecular process at the leukocyte plasma membrane, *Biosci. Rep.* 19 (1999) 273–281.
- [29] A. Gilsanz, L. Sanchez-Martin, M.D. Gutierrez-Lopez, S. Ovalle, Y. Machado-Pineda, R. Reyes, G.W. Swart, C.G. Figdor, E.M. Lafuente, C. Cabanas, ALCAM/CD166 adhesive function is regulated by the tetraspanin CD9, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 475–493.
- [30] P. Groscurth, S. Diener, R. Stahel, L. Jost, D. Kagi, H. Hengartner, Morphologic analysis of human lymphokine-activated killer (LAK) cells, *Int. J. Cancer* 45 (1990) 694–704.
- [31] M.D. Gutierrez-Lopez, S. Ovalle, M. Yanez-Mo, N. Sanchez-Sanchez, E. Rubinstein, N. Olmo, M.A. Lizarbe, F. Sanchez-Madrid, C. Cabanas, A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated β 1 integrin, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 208–218.
- [32] M.D. Gutierrez-Lopez, A. Gilsanz, M. Yanez-Mo, S. Ovalle, E.M. Lafuente, C. Dominguez, P.N. Monk, I. Gonzalez-Alvaro, F. Sanchez-Madrid, C. Cabanas, The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 3275–3292.
- [33] E.S. Harris, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, The leukocyte integrins, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23409–23412.
- [34] M.E. Hemler, Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19 (2003) 397–422.
- [35] M.E. Hemler, Tetraspanin functions and associated microdomains, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 801–811.
- [36] M.E. Hemler, Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages, *Nat. Rev. Cancer* 14 (2013) 49–60.

- [37] A. Higginbottom, Y. Takahashi, L. Bolling, S.A. Coonrod, J.M. White, L.J. Partridge, P.N. Monk, Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 208–214.
- [38] S.H. Ho, F. Martin, A. Higginbottom, L.J. Partridge, V. Parthasarathy, G.W. Moseley, P. Lopez, C. Cheng-Mayer, P.N. Monk, Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 80 (2006) 6487–6496.
- [39] N. Hogg, I. Patzak, F. Willenbrock, The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 416–426.
- [40] N. Hogg, M. Laschinger, K. Giles, A. McDowall, T-cell integrins: more than just sticking points, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 4695–4705.
- [41] G.D. Keizer, J. Borst, C.G. Figdor, H. Spits, F. Miedema, C. Terhorst, J.E. De Vries, Biochemical and functional characteristics of the human leukocyte membrane antigen family LFA-1, Mo-1 and p150,95, *Eur. J. Immunol.* 15 (1985) 1142–1148.
- [42] M. Kim, C.V. Carman, W. Yang, A. Salas, T.A. Springer, The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin α L β 2, *J. Cell Biol.* 167 (2004) 1241–1253.
- [43] O.V. Kovalenko, X. Yang, T.V. Kolesnikova, M.E. Hemler, Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking, *Biochem. J.* 377 (2004) 407–417.
- [44] D.F. Kucik, M.L. Dustin, J.M. Miller, E.J. Brown, Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2139–2144.
- [45] F. Le Naour, M. Andre, C. Boucheix, E. Rubinstein, Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts, *Proteomics* 6 (2006) 6447–6454.
- [46] S. Levy, T. Shoham, The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 136–148.
- [47] Q. Li, A. Lau, T.J. Morris, L. Guo, C.B. Fordyce, E.F. Stanley, A syntaxin 1, α L β 2, and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization, *J. Neurosci.* 24 (2004) 4070–4081.
- [48] A. Luque, M. Gomez, W. Puzon, Y. Takada, F. Sanchez-Madrid, C. Cabanas, Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355–425) of the common β 1 chain, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 11067–11075.
- [49] M. Miyake, M. Koyama, M. Seno, S. Ikeyama, Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility, *J. Exp. Med.* 174 (1991) 1347–1354.
- [50] N. Ouchi, S. Kihara, S. Yamashita, S. Higashiyama, T. Nakagawa, I. Shimomura, T. Funahashi, K. Kameda-Takemura, S. Kawata, N. Taniguchi, et al., Role of membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 on macrophages, *Biochem. J.* 328 (1997) 923–928.
- [51] S. Ovalle, M.D. Gutierrez-Lopez, N. Olmo, J. Turnay, M.A. Lizarbe, P. Majano, F. Molina-Jimenez, M. Lopez-Cabrera, M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid, et al., The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells, *Int. J. Cancer* 121 (2007) 2140–2152.
- [52] J.C. Porter, N. Hogg, Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters α 4 β 1- and α 5 β 1-mediated function, *J. Cell Biol.* 138 (1997) 1437–1447.
- [53] M.J. Robertson, M.A. Caligiuri, T.J. Manley, H. Levine, J. Ritz, Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity, *J. Immunol.* 145 (1990) 3194–3201.
- [54] J.L. Rodriguez-Fernandez, M. Gomez, A. Luque, N. Hogg, F. Sanchez-Madrid, C. Cabanas, The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 1891–1907.
- [55] J.L. Rodriguez-Fernandez, L. Sanchez-Martin, M. Rey, M. Vicente-Manzanares, S. Narumiya, J. Teixido, F. Sanchez-Madrid, C. Cabanas, Rho and Rho-associated kinase modulate the tyrosine kinase PYK2 in T-cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40518–40527.
- [56] M. Sala-Valdes, A. Ursa, S. Charrin, E. Rubinstein, M.E. Hemler, F. Sanchez-Madrid, M. Yanez-Mo, EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 19665–19675.
- [57] A. Salas, M. Shimaoka, A.N. Kogan, C. Harwood, U.H. von Andrian, T.A. Springer, Rolling adhesion through an extended conformation of integrin α L β 2 and relation to α I and β I-like domain interaction, *Immunity* 20 (2004) 393–406.
- [58] F. Sanchez-Madrid, J.A. Nagy, E. Robbins, P. Simon, T.A. Springer, A human leukocyte differentiation antigen family with distinct α -subunits and a common β -subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule, *J. Exp. Med.* 158 (1983) 1785–1803.
- [59] P. Sanchez-Mateos, C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, Regulation of integrin function, *Semin. Cancer Biol.* 7 (1996) 99–109.
- [60] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 676–682.
- [61] C. Schmidt, V. Kunemund, E.S. Wintergerst, B. Schmitz, M. Schachner, CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the α 6 β 1 integrin and the neural adhesion molecule L1, *J. Neurosci. Res.* 43 (1996) 12–31.
- [62] N. Shibagaki, K. Hanada, H. Yamashita, S. Shimada, H. Hamada, Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1/ICAM-1-mediated cell–cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 4081–4091.
- [63] T.N. Sims, M.L. Dustin, The immunological synapse: integrins take the stage, *Immunol. Rev.* 186 (2002) 100–117.
- [64] P.M. Sincok, G. Mayrhofer, L.K. Ashman, Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and α 5 β 1 integrin, *J. Histochem. Cytochem.* 45 (1997) 515–525.
- [65] O. Soderberg, M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K.J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L.G. Larsson, et al., Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation, *Nat. Methods* 3 (2006) 995–1000.
- [66] T.A. Springer, M.L. Dustin, T.K. Kishimoto, S.D. Marlin, The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system, *Annu. Rev. Immunol.* 5 (1987) 223–252.
- [67] C.S. Stipp, T.V. Kolesnikova, M.E. Hemler, Functional domains in tetraspanin proteins, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 106–112.
- [68] I. Tachibana, M.E. Hemler, Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 893–904.
- [69] Y. Takeda, I. Tachibana, K. Miyado, M. Kobayashi, T. Miyazaki, T. Funakoshi, H. Kimura, H. Yamane, Y. Saito, H. Goto, et al., Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes, *J. Cell Biol.* 161 (2003) 945–956.
- [70] T. Tohami, L. Drucker, J. Radnay, H. Shapira, M. Lishner, Expression of tetraspanins in peripheral blood leukocytes: a comparison between normal and infectious conditions, *Tissue Antigens* 64 (2004) 235–242.
- [71] Y. van Kooyk, C.G. Figdor, Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 542–547.
- [72] Y. van Kooyk, P. van de Wiel-van Kemenade, P. Weder, T.W. Kuijpers, C.G. Figdor, Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes, *Nature* 342 (1989) 811–813.
- [73] Y. van Kooyk, E. van de Wiel-van Kemenade, P. Weder, R.J. Huijbens, C.G. Figdor, Lymphocyte function-associated antigen 1 dominates very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 185–190.
- [74] T.S. van Zanten, A. Cambi, M. Koopman, B. Joosten, C.G. Figdor, M.F. Garcia-Parajo, Hotspots of GPI-anchored proteins and integrin nanoclusters function as nucleation sites for cell adhesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 18557–18562.
- [75] S.E. VanCompernelle, S. Levy, S.C. Todd, Anti-CD81 activates LFA-1 on T cells and promotes T cell–B cell collaboration, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 823–831.
- [76] I. Weibrecht, K.J. Leuchowius, C.M. Clauson, T. Conze, M. Jarvius, W.M. Howell, M. Kamali-Moghaddam, O. Soderberg, Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox, *Expert Rev. Proteomics* 7 (2010) 401–409.
- [77] M. Yanez-Mo, O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdes, F. Sanchez-Madrid, Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes, *Trends Cell Biol.* 19 (2009) 434–446.
- [78] M. Yanez-Mo, A. Alfranca, C. Cabanas, M. Marazuela, R. Tejedor, M.A. Ursa, L.K. Ashman, M.O. de Landazuri, F. Sanchez-Madrid, Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with α 3 β 1 integrin localized at endothelial lateral junctions, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 791–804.
- [79] R.L. Yauch, M.E. Hemler, Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase, *Biochem. J.* 351 (Pt 3) (2000) 629–637.

